

Aus dem
Zentrum für Zahnmedizin
Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin
Humboldt-Universität zu Berlin
Charité, Campus Virchow-Klinikum
Direktor: Prof. Dr. Jean-François Roulet

Untersuchungen zur Keimreduktion im Wurzelkanal

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach
Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin

vorgelegt von

Dr. med. dent. Claudia R. Barthel-Zimmer

Eröffnung des Habilitationsverfahrens: 6.3.2001

Abschluss des Habilitationsverfahrens: 2.10.2001

Gutachter:

Prof. Dr. Elmar Hellwig, Universität Freiburg

Prof. Dr. Claus Löst, Universität Tübingen

Für

Stefan

Meine Eltern

Martin und Mary

Meine Abteilung

Andreas, Michael und Fred

Inhaltsverzeichnis

VORBEMERKUNG	6
1 EINLEITUNG	7
2 LITERATURÜBERSICHT	11
2.1 Apikale Parodontitis	11
2.1.1 Pathologie	11
2.1.2 Ätiologie der apikalen Parodontitis	14
2.1.3 Mikrobiologische Aspekte	18
2.2 Desinfektion des Wurzelkanalsystems	24
2.2.1 Mechanische Aufbereitung	24
2.2.2 Spüllösungen	26
2.2.2.1 Natriumhypochlorit	26
2.2.2.2 Chlorhexidin	32
2.2.3 Medikamentöse Zwischeneinlagen	37
2.2.3.1 Kalziumhydroxid	39
2.2.3.2 Lokale Antibiotikum-Kortikoid-Kombinationspräparate	47
2.3 Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen	50
2.3.1 Farbstoffpenetrationstests	52
2.3.2 Penetrationstests mit Bakterien	56
3 ZIELSTELLUNG	60
4 STUDIE 1: DIE FREISETZUNG VON TNF-α AUS LPS EXPONIERTE MONOZYTEN NACH VORBEHANDLUNG MIT KALZIUMHYDROXID	62
4.1 Zielstellung	62
4.2 Material und Methode	63
4.3 Ergebnisse	65

4.4	Diskussion	66
4.5	Schlussfolgerungen	68
5	STUDIE 2: ANTIMIKROBIELLE EIGENSCHAFTEN VON CHLORHEXIDIN UND KALZIUMHYDROXID IN UNTERSCHIEDLICHEN DARREICHUNGSFORMEN. EIN <i>IN-SITU</i> - MODELL	70
5.1	Zielstellung	70
5.2	Material und Methode	72
5.2.1	Vorbereitung der Zähne	73
5.2.2	Probengewinnung	74
5.3	Ergebnisse	76
5.4	Diskussion	81
5.5	Schlussfolgerungen	84
6	STUDIE 3: DIE BAKTERIELLE DICHTIGKEIT VON WURZELKANALFÜLLUNGEN IN KOMBINATION MIT ADHÄSIVEN DECKFÜLLUNGEN ODER PROVISORISCHEN FÜLLUNGSMATERIALIEN	85
6.1	Zielstellung	85
6.2	Material und Methode	87
6.2.1	Präparation der Zähne	88
6.2.2	Bakterielles Setup	89
6.3	Ergebnisse	91
6.4	Diskussion	95
6.5	Schlussfolgerungen	99

7	STUDIE 4: UNTERSUCHUNGEN ZUR BAKTERIELLEN PENETRATION IN WURZELKANALGEFÜLLTEN ZÄHNEN NACH APPLIKATION UNTERSCHIEDLICHER MEDIKAMENTÖSER EINLAGEN	100
7.1	Zielstellung	100
7.2	Material und Methode	102
7.3	Ergebnisse	104
7.4	Diskussion	107
7.5	Schlussfolgerungen	110
8	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	111
9	SCHLUSSFOLGERUNGEN	129
10	ZUSAMMENFASSUNG	130
11	SUMMARY	133
11.1	Summary of study 1	133
11.2	Summary of study 2	133
11.3	Summary of study 3	134
11.4	Summary of study 4	134
12	LITERATUR	136
13	GLOSSAR/ABKÜRZUNGEN	176
14	DANKSAGUNG	177

Vorbemerkung

In der folgenden Arbeit werden vier Studien vorgestellt, die in der abschließenden Diskussion in einen Kontext gebracht werden. Die Literatur ist in Reihenfolge ihres Erscheinens am Ende der Arbeit zu finden. Auf die Bezeichnung TM oder [®] wurde verzichtet, hieraus kann jedoch nicht geschlossen werden, dass die entsprechenden Präparate nicht geschützt sind.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder befinden sich im Druck:

Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endod J 1997; 30 155-9.

Barthel CR, Zimmer S, West G, Roulet JF. Bacterial leakage in obturated root canals following the use of different intracanal medicaments. Endod Dent Traumatol 2000; 16: 282-86.

Barthel CR, Zimmer S, Wussogk R, Roulet JF. Long term bacterial leakage along obturated roots restored with temporary and adhesive fillings. J Endod 2001 (im Druck).

Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Göbel B, Roulet JF. *In-situ* antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: Gel and paste vs. gutta-percha points. J Endod 2002 (im Druck).

1 Einleitung

Endodontologie ist das Fachgebiet, das sich mit Morphologie, Physiologie und Pathologie des Pulpa-Dentin-Komplexes sowie den damit assoziierten klinischen Maßnahmen wie Diagnostik, Prävention und Therapie befasst. Obwohl die Pulpa aus den typischen körpereigenen Strukturen wie z.B. Bindegewebe, Nerven, Blut- oder Lymphgefäßen besteht, stellt sie in mehrfacher Hinsicht einen Sonderfall dar (1). Sie ist abgesehen von mehreren kleinen Foramina am Apex des Zahnes vollständig von einem unnachgiebigen Hartgewebemantel umschlossen, zudem besitzt sie keine kollaterale Blutzirkulation. Dies erfordert spezielle Mechanismen zur Reaktion auf Druck- oder entzündliche Veränderungen. Hierzu verfügt die Pulpa über ein differenziertes Drainagesystem, das sich durch Lymphgefäße, Arteriolen und Venolen mit speziellen Anastomosen und Shunts auszeichnet (2). Da sich die Pulpa nicht ausdehnen kann, würde eine Zunahme des Blutvolumens und des interstitiellen Gewebedruckes in der Pulpa zu einem dem Blutdruck entsprechenden Druck führen. Dies würde wiederum in einem Kollaps der Gefäße und damit einem Stillstand der pulpalen Blutzirkulation resultieren. Durch komplexe, teilweise lokale Regulationsmechanismen der pulpalen Gefäße wird dem jedoch so entgegengewirkt, dass eine Drainage und damit ein idealer Druckausgleich möglich wird (3-6).

Außerdem besitzt die Pulpa neuroregulative Mechanismen: Die überwiegend sensorischen Nervenfasern haben im Vergleich zum den Zahn umgebenden parodontalen Ligament oder dem Knochen eine wesentlich höhere Dichte (7). Durch Stimulation können sie vasoregulative Neuropeptide ausschütten, die einen Entzündungsprozess in Gang setzen, es wird von einer neuronalen Entzündung gesprochen (8-10).

Zusätzlich kann sich die Pulpa durch Aktivierung der im Körper einmaligen Zellpopulation der Odontoblasten bedingt vor Noxen schützen. Durch Neubildung von Dentin an der Pulpa-Dentin-Grenze in einer Stärke von täglich bis zu 1,5µm findet ein räumlicher Rückzug der Pulpa statt (11). Gleichzeitig erfolgt an der äußersten Front, nach peripher, eine Mineralisation der Dentintubuli, u.a. durch

Präzipitation von Mineralsalzen (12). Von einer dauerhaften Schutzfunktion dieser Barrieren kann jedoch nicht ausgegangen werden (13, 14).

Die Pulpa hat mit den hier angedeuteten Mechanismen eine gute Abwehrfähigkeit, sie ist in der Lage, langsam fortschreitende (chronische) Reize bis zu einem gewissen Grad zu kompensieren. Permanente Attrition und Abrasion, Prozesse, die zum externen Abtrag von Zahnhartsubstanz durch den Kauvorgang führen, sind physiologische Prozesse, die die Pulpa zu einer kontinuierlichen Produktion von Dentin anregen. Dieses nach dem Zahndurchbruch gebildete Dentin wird als Sekundärdentin bezeichnet. Als unphysiologisch muss jedoch der Substanzverlust durch Bruxismus oder Erosion betrachtet werden. Diese Vorgänge führen in der Pulpa zu einer beschleunigten Bildung von neuem Dentin, das in der Literatur als Reizdentin (15) oder irreguläres Sekundärdentin (16) bezeichnet wird. Reiz- oder irreguläres Dentin findet sich je nachdem, wieviel Zeit für die Bildung zur Verfügung war, als regelmäßiges, tubuläres Dentin bis hin zu sehr unregelmäßigen Formen, die überhaupt keine tubuläre Struktur und oft auch Zelleinschlüsse aufweisen.

Noch gravierendere Folgen haben physikalische Traumata, iatrogene Manipulationen und kariöse Prozesse für die Pulpa. Hierbei hängt die Prognose für die Gesunderhaltung der Pulpa maßgeblich von der Abwesenheit oder Präsenz von Mikroorganismen ab. Eine durch Trauma freigelegte Pulpa kann einen Hartgewebe-Verschluss herstellen, solange keine oder nur eine minimale Invasion von Mikroorganismen stattfindet und eine ausreichende Blutversorgung von apikal gewährleistet ist (17-23).

Im Falle eines kariösen Prozesses nähern sich Mikroorganismen aus der Mundhöhle der Pulpa durch Demineralisation und Auflösen der Zahnhartsubstanzen. Sobald die Schmelz-Dentin-Grenze erreicht ist, beginnt die Pulpa mit ihren Abwehrreaktionen (Abb. 1). Bergenholtz konnte in mehreren tierexperimentellen Studien zeigen, dass bakterielle Zellwandbestandteile oder lösliche Plaquebestandteile im Dentin ohne direkten Kontakt zur Pulpa bzw. ohne eigentliche Präsenz der Bakterien selbst in der Pulpa zu entzündlichen Veränderungen führen (24-27).

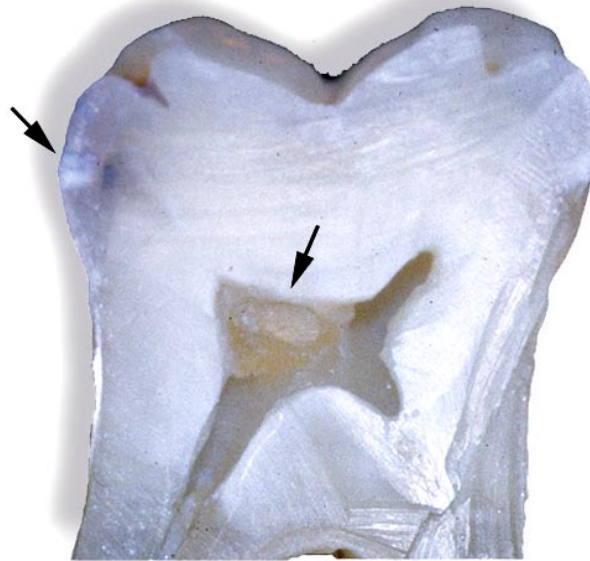


Abb. 1:
Reizdentinbildung im Bereich eines Pulphahornes (rechter Pfeil) bei Vorliegen einer Initialkaries (linker Pfeil)

Die gesunde Pulpa verfügt über immunkompetente Zellen wie Makrophagen, die sich eher zentral befinden (28, 29) oder T-Zellen, wohingegen B-Zellen und Plasmazellen selten oder gar nicht nachzuweisen sind (30, 28, 31). Entzündliche Reaktionen der Pulpa führen zu verstärkter Präsenz von Monozyten und Granulozyten, die in die nichtspezifische und spezifische Körperabwehr involviert sind (24, 32, 31, 33).

Sind Anzahl bzw. Pathogenität der Mikroorganismen überwältigend, kommt es zunächst zur Bildung von Mikroabszessen, anschließend zur Gewebsnekrose, die von koronal nach apikal fortschreitet. Dieser Zustand ist für den Körper eine Ausnahmesituation: in einem Hohlraum (Zahninneres), der zum Körper hin offen

ist, befindet sich eine Vielzahl von Mikroorganismen, die nekrotisches Gewebe als Nahrungsgrundlage haben und sich stetig vermehren. Der Körper hat keinerlei Chance, diese Mikroorganismen abzuwehren, da durch die Nekrose der Antransport abwehrfähiger Strukturen unmöglich geworden ist (34). Die Abwehr findet daher im periapikalen Gewebe statt, ist jedoch vergebens, da der ursächliche Problembereich, das Zahninnere, nicht erreicht wird und dadurch auch keine Elimination von Mikroorganismen stattfinden kann.

Abhilfe kann hierbei nur durch einen zahnärztlichen Eingriff geschaffen werden. Durch Eröffnung der Pulpakammer, Entfernung möglichst aller infizierter Gewebe und anschließende Applikation eines dichten Verschlusses zur Verhinderung einer Re-Infektion wird dem Körper eine Chance zur Wiederherstellung des durch den Abwehrvorgang geschädigten periapikalen Gewebes gegeben.

Aber kann das Wurzelkanalsystem überhaupt so gereinigt werden und kann der Zahn so verschlossen werden, dass eine Regeneration des periapikalen Gewebes gewährleistet ist? Mit diesen Punkten beschäftigt sich die vorliegende Arbeit, indem die Desinfektion des Wurzelkanalsystems mittels medikamentöser Einlagen untersucht und die Machbarkeit eines bakteriendichten Verschlusses betrachtet wird.

2 Literaturübersicht

2.1 Apikale Parodontitis

2.1.1 Pathologie

Die apikale Parodontitis kann in zwei Formen eingeteilt werden, akut und chronisch. Die akute apikale Parodontitis kann primär auftreten, das heißt, durch Trauma oder Infektion wird gesundes Gewebe entzündlich verändert. Sie kann aber auch sekundär eintreten, nachdem bereits eine chronische Entzündung vorgelegen hatte. In diesem Falle wird sie auch als „Phönix-Abszess“, „sekundärer Abszess“ oder „Flare-up“ bezeichnet (34).

Die akute apikale Parodontitis zeigt den klassischen Verlauf aller akuten Entzündungen mit Vasodilatation, Extravasation und chemotaktisch ausgelöster Migration von zumeist polymorphkernigen Granulozyten, die die erste Abwehrfront darstellen (35). Granulozyten besitzen primäre, sekundäre und tertiäre Granulae (34), in denen bis zu 50 verschiedene Enzyme nachweisbar sind. Zu diesem Zeitpunkt sind Mikroorganismen bereits durch Serumfaktoren opsoniert (36). Dies führt zu einer Triggerung der Granulozyten und verbesserter Phagozytose. Die Ausschüttung destruktiver Enzyme führt jedoch nicht nur zur Abtötung von Mikroorganismen sondern auch zur Degradierung körpereigener Strukturen. Im Verlauf der Entzündung werden u.a. Prostaglandine freigesetzt, von denen PGI_2 und PGE_2 besondere Aufmerksamkeit verdienen, da sie zur Aktivierung von Osteoklasten führen. Es wird angenommen, dass der schnelle Verlust von Knochen im Rahmen eines akut entzündlichen Geschehens auf die massive Ansammlung polymorphkerniger Granulozyten zurückzuführen ist, die die Hauptquelle für PGE_2 darstellen. So wurden stark erhöhte PGE_2 -Werte bei akuten apikalen Entzündungen gefunden (37).

Im Falle eines non-infektiösen entzündlichen Geschehens (z.B. traumatogen) wandelt sich der Prozess in eine regenerative Form um, es kommt zu einer Ausheilung des apikalen Parodontiums. Radiologisch ist hierbei zumeist kein pathologischer Befund diagnostizierbar (38). Sind jedoch Mikroorganismen involviert, so persistiert die Entzündung. Hierbei können unterschiedliche

Verlaufsformen auftreten. Bei weiterhin akutem Verlauf kann ein Abszess entstehen, es kann auch zur Fistelbildung oder zu einer Chronifizierung des Geschehens kommen.

Die chronisch apikale Parodontitis wird häufig auch als „apikales Granulom“ bezeichnet und besteht aus Granulationsgewebe und entzündlichem zellulären Infiltrat (34). Etwa 45% aller apikalen Granulome zeigen histologisch Anhäufungen von Epithelzellen (35), die sich unterschiedlich anordnen können. Häufig bilden sie ein epitheliales Attachment zur Wurzeloberfläche (39, 40). Das periapikale Gewebe zeigt Anhäufungen von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen. Über das Verhältnis von T- zu B-Zellen und Helfer- zu Supressorzellen besteht Uneinigkeit (41-48). Dies mag damit zusammenhängen, dass die Quantifizierung von Zellpopulationen immer nur eine Momentaufnahme darstellt und damit der Verlauf eines Prozesses nur vage interpretiert werden kann.

Eine periapikale oder radikuläre Zyste gehört ebenfalls zu den chronischen Formen der apikalen Parodontitis und ist definiert als Läsion, bei der ein reelles oder imaginäres Lumen von squamösem Epithel umgrenzt ist (49). In der Literatur wird der prozentuale Anteil von Zysten an periapikalen Läsionen zwischen 6 und 55% angegeben (50-64, 35). Nair et al. stellten fest, dass von 256 untersuchten Fällen 52% Epithelzellen zeigten, aber nur in 15% der Fälle handelte es sich tatsächlich um periapikale Zysten (35). Eine Erklärung für die weite Streuung des Auftretens periapikaler Zysten in den oben zitierten Studien mag darin liegen, dass manche Autoren periapikale Granulome als Zysten definiert haben, nur weil Epithelzellen präsent waren. 1980 wurde von Simon die Morphologie von Zysten weiter präzisiert, er definierte die „bay-cyst“ eine Form, bei der das Zystensäckchen zum Wurzelkanal hin offen ist (60). Diese Form wurde von Nair als „periapikale Taschenzyste“ beschrieben, im Gegensatz dazu bezeichnete er die Zyste mit vollständig abgeschlossenem Zystensack als „wahre Zyste“ (35). Da Zysten radiologisch nicht diagnostiziert werden können (50-53, 55, 65, 58), ist es schwierig nachzuweisen, ob sie nach konventioneller Wurzelkanalbehandlung ausheilen, oder ob sie nur durch chirurgisches Vorgehen beseitigt werden können. Da die Erfolgsquote konventioneller orthograder Wurzelkanalbehandlungen an Zähnen mit apikaler

Parodontitis (ohne Differenzierung Zyste/Granulom) mit bis zu 94% angegeben wird (66), kann davon ausgegangen werden, dass sich nicht nur Granulome, sondern auch Zysten in der Regel durch diese Art der Behandlung zur Ausheilung bringen lassen.

Eine Sonderform der chronisch apikalen Parodontitis stellt die kondensierende oder sklerosierende Ostitis dar (Abb. 2) (67). Radiologisch zeigt sich am Apex eine abgegrenzte Knochenverdichtung (68). Ob die Veränderung zwingend mit einer devitalen (34) oder mit einer chronisch entzündeten und damit noch vitalen Pulpa (69) assoziiert ist, scheint nicht eindeutig geklärt. Histologisch zeigt sich eine Anhäufung von Knochentrabekeln, im Knochenmark befinden sich Lymphozyten und das Erscheinungsbild ist von vielen aktiven Osteoblasten geprägt (70, 71). Nach erfolgreicher Wurzelkanalbehandlung löst sich die radiologisch erkennbare Knochenverdichtung in der Regel wieder auf (68). Ein Erklärungsmodell für diese pathologische Veränderung scheint es noch nicht zu geben. Es ist denkbar, dass durch die subchronische Entzündung das Gleichgewicht der Zytokine dahingehend geändert ist, dass eine vermehrte Osteoblastenaktivität ausgelöst wird.

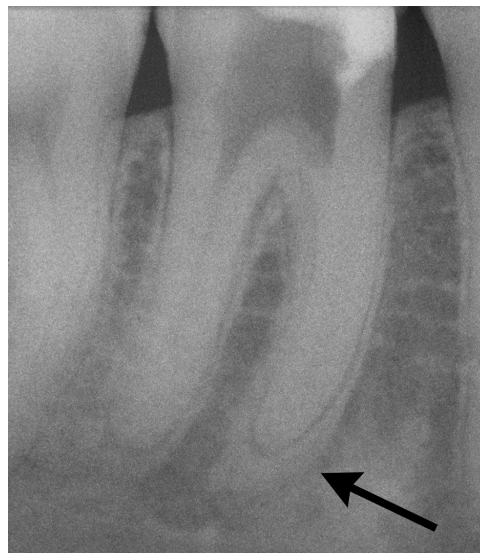


Abb. 2:
Sklerosierende oder kondensierende apikale Ostitis (Pfeil). Vor Eröffnung reagierte die Pulpa sensibel auf Kälte.

2.1.2 Ätiologie der apikalen Parodontitis

Durch die Einwirkung eines mechanischen Traumas auf einen Zahn kann es in der periapikalen Region zur Stauchung oder Zerrung kommen. Ein solches Trauma führt zu einer transienten Entzündung mit Reparaturmechanismen, die in der Regel in einer vollständigen Ausheilung resultieren. Wird durch das Trauma das zuführende pulpare Nerven-Gefäßbündel so geschädigt, dass die Blutzufuhr zur Pulpa unterbrochen ist, so wird diese zunächst ischämisch und nachfolgend nekrotisch. Auch hier kommt es zu den o. g. Reparaturmechanismen des verletzten Zahnhalteapparates. Es ist zwar denkbar, dass das sterile nekrotische Gewebe im Wurzelkanallumen durch die Zersetzung gewisse Reize für das periapikale Gewebe darstellt, in der Regel stellen diese jedoch keine Gefahr dar. Anhand implantierter offener Hohlkammern aus diversen Materialien, die mit sterilem Gewebe oder steriler Gewebeflüssigkeit gefüllt waren, konnte gezeigt werden, dass nekrotisches Gewebe keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das umliegende Gewebe hat (72-74) (Beispiel: Abb. 3 a und b). Sundqvist konnte 1976 demonstrieren, dass Zähne mit desensibler (nekrotischer) Pulpa nur dann radiologische Zeichen einer Knochendestruktion zeigten, wenn auch Mikroorganismen im Wurzelkanal nachweisbar waren (75). Ähnliches konnte in weiteren Studien bestätigt werden. So nekrotisierten Möller et al. 78 Affenpulpen unter aseptischen Bedingungen. 52 dieser Zähne wurden infiziert, die restlichen Zähne unter sterilen Bedingungen verschlossen. Alle steril gehaltenen Pulpen zeigten nach 6-7 Monaten weder histologische noch radiologische Zeichen einer apikalen Entzündung, es konnten keine Mikroorganismen isoliert werden. Alle infizierten Zähne wiesen dagegen eine apikale Parodontitis auf (76). Auch Bergenholtz et al., Klevant et al., Szajkis et al. und Katebzadeh et al. machten ähnliche Beobachtungen (77-80). Nach Andreasen etablieren sich radiologische Zeichen einer devitalen, infizierten Pulpa nach etwa zwei bis drei Wochen in Form eines erweiterten Parodontalspaltes (81).

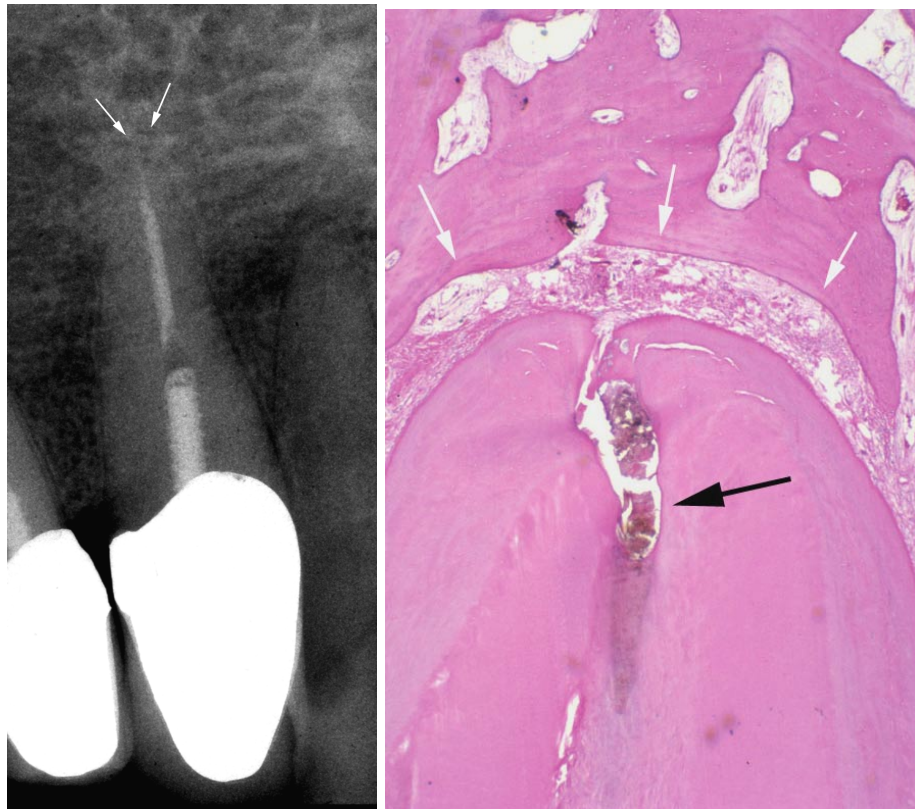


Abb. 3 a

Abb. 3 b

Abbildungen 3 a und b:
Radiografische Darstellung eines endodontisch versorgten Zahnes (3 a) und histologische Darstellung der periapikalen Situation des gleichen Zahnes (HE-Färbung, 25X). Der Parodontalspalt stellt sich radiologisch (3 a) und histologisch (3 b) intakt dar (weisse Pfeile), obwohl im Wurzelkanal nekrotisches Gewebe vorliegt (schwarzer Pfeil).

Ein weiterer ätiologischer Faktor für die Entstehung einer apikalen Parodontitis ist die Besiedlung des Wurzelkanalsystems durch Mikroorganismen. Dies kann primär durch Einwanderung von Keimen in die Pulpa geschehen, beispielsweise infolge eines kariösen Prozesses oder sekundär, nachdem Dentintubuli eröffnet wurden, undichte Füllungen gelegt wurden, Sprünge oder Frakturen im Zahn entstanden sind, oder die Pulpa iatrogen exponiert wurde. Nach Fraktur eines Zahnes können Mikroorganismen *in vitro* innerhalb von sieben Tagen über den Frakturspalt die Pulpakammer erreichen (82). Dieser Zeitraum variiert sicherlich in

Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Frakturspaltes und dem Sklerosierungsgrad der Pulpa. Bei einer vitalen Pulpa ist es denkbar, dass dies länger dauert, da der relativ hohe Druck im Pulpagewebe von etwa 20mm Hg einen Auswärtsfluss von Dentinliquor in den Dentintubuli und möglicherweise auch in einem Frakturspalt zur Folge hat (83, 84), den die Mikroorganismen überwinden müssen. Diese Vermutung konnte indirekt von Nagaoka et al. bestätigt werden, indem sie zeigten, dass Bakterien tiefer in die Dentintubuli von Zähnen mit devitaler Pulpa eindringen als in solche mit vitaler Pulpa (85). Die Autoren präparierten hierzu an 19 Weisheitszahnpaaren 2mm tiefe Klasse-V-Kavitäten bis ins Dentin, ohne diese zu verschließen. Um eine devitale Ausgangssituation zu schaffen, wurde unilateral aus je einem Weisheitszahn die Pulpa exstirpiert. Der homologe Zahn blieb vital. Nach 30 Tagen wurden acht der Zahnpaare extrahiert, nach weiteren 120 Tagen die restlichen elf Zahnpaare. Die Zähne wurden bezüglich ihrer bakteriellen Besiedlung untersucht. Bei den Zähnen mit 30 Tagen Verweildauer konnte kein Unterschied hinsichtlich der mikrobiellen Besiedlung zwischen den vitalen und den devitalen Zähnen festgestellt werden. Bei den Zähnen, die für 150 Tage mit offener Kavität im Munde belassen worden waren, konnten die Autoren eine signifikant stärkere Besiedlung des Dentins der devitalen Zähne beobachten mit Eindringtiefen bis zu 2,1mm. Diese Studie legt die Vermutung nahe, dass Mikroorganismen im Falle einer vitalen Pulpa mehr Zeit benötigen, um nach zentral vorzudringen als im Falle einer devitalen Pulpa.

Eine gesunde Pulpa kann Infektionen in der Regel bis zu einem gewissen Grad auffangen, womit einer apikalen Parodontitis vorgebeugt wird. Handelt es sich jedoch um eine vorgeschädigte, entzündete oder gar nekrotische Pulpa, so ist die vollständige Besiedlung durch Mikroorganismen und die daraus resultierende apikale Parodontitis nur eine Frage der Zeit.

Ein Sonderfall mikrobiologisch provozierter apikaler Parodontitis ist die periapikale Aktinomykose, die u.a. durch *Actinomyces israelii*, *Propionibacterium propionicum*, *Actinomyces naeslundii*, oder *Actinomyces viscosus* hervorgerufen werden kann. Etwa 50-63% der im Menschen vorkommenden Aktinomykosen treten im Hals-Kopf-Bereich auf, 35% finden sich thorakal oder abdominal und werden auf

eine Verschleppung aus dem Hals/Kopfbereich zurückgeführt (86, 87). Eine herkömmliche Wurzelkanaltherapie stellt hier insofern ein Problem dar, als die Mikroorganismen die Fähigkeit besitzen, sich in vitalem Gewebe aufzuhalten und sich der Körperabwehr zu entziehen, d.h., sie können sich jenseits des Wurzelkanalsystems befinden und damit von den reinigenden und desinfizierenden zahnärztlichen Maßnahmen nicht erreicht werden (88-91).

Das Problem der anachorestischen, retrograden Infektion der Pulpa als ätiologischer Faktor für eine periapikale Parodontitis wird kontrovers diskutiert. Manche Autoren konnten in experimentell vorgeschädigten Pulpen nach Bakteriämie Mikroorganismen aus der Pulpa isolieren (92-95). Dies muss jedoch nicht zwingend zu einer Pulpanekrose und einer apikalen Parodontitis führen. Im Gegensatz zu den soeben zitierten Studien konnten Delivanis und Fan in ihrer tierexperimentellen Studie selbst zwei Monate nach Pulpektomie und wiederholten intravenösen Gaben von *Streptococcus sanguis* im Pulpalumen keine Mikroorganismen nachweisen, außer, es war während der Bakteriämie über den Apex hinaus instrumentiert worden (96). Es ist sicherlich möglich, dass nach generalisierter Bakteriämie eine retrograde Infektion einer geschwächten Pulpa eintreten kann, es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass solche Fälle äußerst selten vorkommen.

Ein weiterer ätiologischer Faktor für eine apikale Parodontitis ist die Verschleppung von Fremdkörpern ins periapikale Gewebe. Hierbei können sich durch nicht resorbierbare Substanzen Fremdkörpergranulome bilden, z.B. durch Speisereste, die über große kariöse Läsionen in das Wurzelkanalsystem und das periapikale Gewebe gelangt sind (97). In den meisten Fällen sind jedoch vermutlich iatrogene Manipulationen der Grund für apikale Entzündungen dieser Art, vor allen Dingen die fehlerhafte Handhabung von Papierspitzen, die aus nicht resorbierbaren Zellulosefasern bestehen (98-101). Prinzipiell sind aber auch das zahnärztliche Arbeiten unter nicht aseptischen Bedingungen, Überstopfen von Sealer, Guttapercha oder toxischen Medikamenten über den Apex als Ursache für eine iatrogen provozierte apikale Parodontitis denkbar. Sirén et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen zahnärztlicher Behandlung und mikrobiologischem Status von Wurzelkanälen (102). Sie ließen in mehreren Zahnarztpraxen Mikroorganismen

aus infizierten Wurzelkanälen isolieren und teilten die Zähne in zwei Gruppen. Gruppe eins wurden alle Zähne zugeordnet, die Problemkeime beherbergten (etwa Enterobakterien und *Pseudomonas* sp.). Zur Gruppe zwei wurden alle übrigen Zähne zugeordnet. Durch einen Fragebogen an die Praktiker konnten die Autoren feststellen, dass in Gruppe eins (Problemkeime) signifikant öfter Zähne vertreten waren, die entweder zwischen den Behandlungssitzungen offen gelassen worden waren oder bei denen mehr als zehn Sitzungen stattgefunden hatten bzw. bei wurzelkanalbehandelten Zähnen, die revidiert worden waren. Da Enterokokken in Erstinfektionen eher selten vorkommen (103, Byström, 1985 #249, 104), ist die Vermutung der Autoren wahrscheinlich, die für die Gruppe eins eine iatrogene Keimverschleppung annahmen. Die Autoren wiesen mit dieser Studie erneut auf die dringende Notwendigkeit einer durchgehend aseptischen Arbeitsweise während einer endodontischen Behandlung hin. Das Legen von Kofferdam ist keine Gewährleistung für aseptische Arbeitsweise, u.a. muss das Arbeitsfeld desinfiziert und eine sterile Handhabung des Instrumentariums beachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für persistierende apikale Parodontitiden und deren unterschiedliche Verlaufsformen in der Regel Mikroorganismen und - eher selten - Fremdkörper verantwortlich sind.

2.1.3 Mikrobiologische Aspekte

Obwohl im Munde mehr als 300 Bakterienspezies identifiziert wurden (105, 106), konnte diese Zahl durch aus dem Wurzelkanalsystem isolierte Keime noch nicht erreicht werden. Dies hängt u.a. mit dem speziellen Milieu im Wurzelkanal zusammen, das durch Sauerstoffarmut gekennzeichnet ist, was vielen aeroben Keimen das Überleben erschwert. Über 80% der im Wurzelkanalsystem zu findenden Keime gehören zu den Anaerobiern (Tab. 1). Es wurden aber durchaus auch Wurzelkanäle mit 100% obligaten Anaerobiern identifiziert (107). Die Anzahl gewonnener Keime hängt von der Entnahme-, Verarbeitungs- und Kultivierungstechnik sowie der Auswahl der Zähne ab.

Tabelle 1:

Prozentualer Anteil anaerober Spezies von aus Wurzelkanälen isolierten Mikroorganismen

<i>Jahr</i>	<i>Autor</i>	<i>Anzahl untersuchter Wurzelkanäle mit kultivierbaren Bakterien</i>	<i>Anzahl isolierte Spezies pro Studie</i>	<i>Davon anaerobe Spezies</i>
1957	MacDonald (108)	38	71	32%
1957	Brown & Rudolph (109)	59	160	24%
1957	Chirnside (110)	15	39	56%
1961	Engström & Frostell (111)	21	42	62%
1966	Möller (112)	29	83	74%
1974	Bergenholtz (77)	54	218	78%
1974	Kantz & Henry (113)	22	377	27%
1975	Wittgow (114)	32	60	76%
1976	Sundqvist (75)	18	88	>90%
1981	Byström & Sundqvist (115)	15	89	88%
1983	Byström & Sundqvist (116)	30	169	88%
1989	Sundqvist (117)	72	134	91%
1990	Ando & Hoshino (107)	8	45	80%
1997	Le Goff et al. (118)	18	84	81%

So wurde das Verhältnis zwischen aeroben und anaeroben Mikroorganismen beginnend mit Studien aus den 50er Jahren bis heute nahezu vollständig umgekehrt. Dies hängt sicherlich mit der in jüngerer Zeit veränderten Probengewinnung zusammen. Sie wird z.T. unter Stickstoff-Begasung oder mit speziellen vorreduzierten Transportmedien durchgeführt, um eine möglichst geringe Sauerstoffexposition der Mikroorganismen zu gewährleisten (113, 119). Im Gegensatz zu den meisten in der Tabelle 1 zitierten Studien verwendeten Baumgarten und Falkler keine Zähne mit intakten Kronen mit apikaler Parodontitis, sondern kariöse Zähne (120). Sie fanden in den apikalen 5mm der Wurzeln nur 68%

obligate Anaerobier. Es ist denkbar, dass durch den kariösen Prozess ein anderes Mikromilieu im Wurzelkanal entsteht, das das Gleichgewicht zwischen aeroben und anaeroben Keimen etwas verschiebt.

Die Anzahl an Mikroorganismen im Wurzelkanal beträgt in der Regel zwischen 10^3 und 10^8 kolonienbildenden Einheiten (CFU) (113, 103, 116, 117). Die Größe der apikalen Knochendestruktion korreliert signifikant mit der Anzahl von Mikroorganismen im Wurzelkanal (75, 121).

Interessanterweise finden sich meistens in jeweils einem Wurzelkanal Mischinfektionen. Wittgow und Sabiston fanden nur in 22% der Fälle eine, sonst bis zu 6 Spezies (114) ; Sundqvist isolierte in 19% der Fälle nur eine Spezies sonst bis zu 12 pro Kanal (75). Byström und Sundqvist (115) konnten 1-10 Spezies pro Kanal identifizieren, Ando und Hoshino 2-13 Spezies (107), Le Goff et al. 2-8 Spezies (118) und Sjögren et al. 1-6 Species (66). Erstaunlicherweise ist in Fällen, in denen sich nach Wurzelkanalbehandlung keine Ausheilung einstellte, eine andere Flora im Wurzelkanal zu finden. Die Anzahl der Fälle mit Mischinfektionen ist deutlich geringer, dafür finden sich häufiger Monoinfektionen (122-124).

Fabricius et al. isolierten am Affen aus einem infizierten Wurzelkanal acht Spezies in unterschiedlicher Anzahl, mit denen sie weitere Zähne inokulierten (103). Sie brachten die gewonnenen Mikroorganismen allerdings nicht im Originalverhältnis in die Wurzelkanalsysteme ein, sondern zu gleichen Teilen. Nach sechs Monaten hatte sich wieder das gleiche Verhältnis eingestellt wie beim Ausgangszahn, *Bacteroides oralis* dominierte signifikant, während zwei fakultativ anaerobe Streptokokkenspezies substanziell reduziert waren. Mit Fortdauer der Infektion nahm auch die relative Anzahl an obligaten Anaerobiern zu, außerdem befanden sich im apikalen Anteil des Wurzelkanales mehr Anaerobier als im koronalen Hauptkanal (125).

Vom Verhältnis der Anzahl an Mikroorganismen pro Spezies zueinander bzw. der Präsenz bestimmter Keime hängt auch die Pathogenität der Infektion ab. Gell et al. konnten tierexperimentell einen klaren Synergismus zwischen *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* nachweisen (126). Nakano-Hasegawa et al. sprechen von einem Biofilm, der im Wurzelkanal entsteht (127). Es besteht also ein

ausgewogenes Mikro-Biotop, in dem komplexe Abhängigkeiten der Spezies untereinander auftreten. Manche Mikroorganismen sind auf Stoffwechselprodukte anderer angewiesen, um überleben zu können (128) (Abb. 4). Es existieren jedoch auch Mechanismen, mit denen manche Mikroorganismen andere am Wachstum hindern. Van Winkelhoff et al. konnten zeigen, dass *Porphyromonas endodontalis* das Wachstum mehrerer *Bacteroides* Spezies hemmt (129).

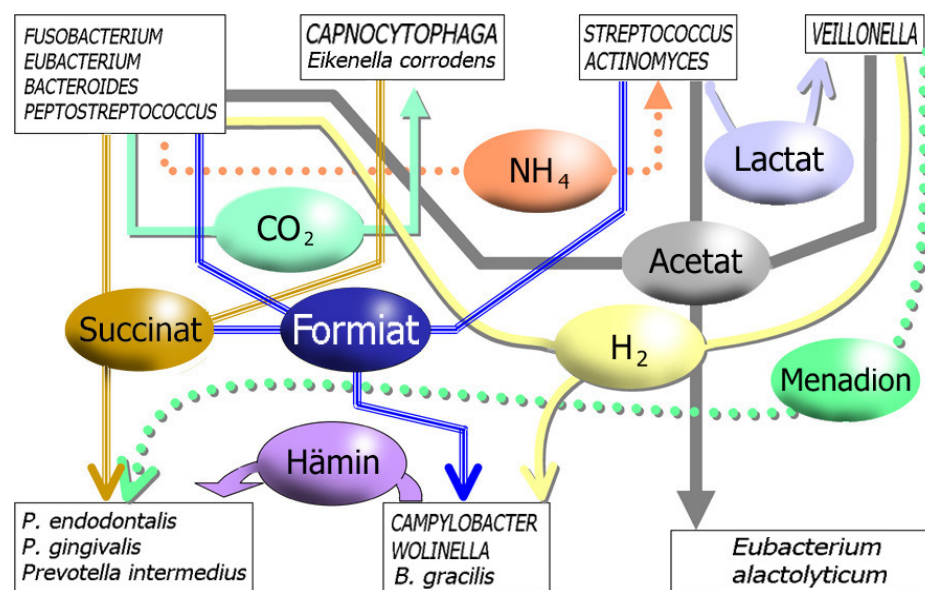


Abbildung 4:

Darstellung der gegenseitigen Verwertung von Stoffwechselprodukten einiger Mikroorganismen: So verstoffwechseln beispielsweise VEILLONELLA Lactat, welches von ACTINOMYCES abgegeben wird. VEILLONELLA wiederum geben Acetat ab, das von Eubacterium alactolyticum weiter verstoffwechselt wird (Umzeichnung nach Sundqvist (128)).

Während *Bacteroides oralis* in Kombination mit sieben anderen Spezies zu aggressiver Zerstörung des periapikalen Knochens führte, zeigte sich bei Inokulation mit diesem Keim allein keinerlei apikale Destruktion (103). Einige der Spezies, die die Autoren als Monokulturen inokulierten, konnten nach 6 Monaten in den Kanälen nicht mehr nachgewiesen werden, im Gegensatz zur Inokulation mit der Mischung mehrerer Spezies. Ein ähnliches Experiment aus jüngerer Zeit konnte dies

bestätigen (130). Sundqvist et al. isolierten Mikroorganismen aus Wurzelkanälen und konnten feststellen, dass schwarzpigmentierende *Bacteroides* Spezies eng mit akuten apikalen Abszessen und dem Auftreten von Pus im Wurzelkanal assoziiert waren (117). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Griffe et al., Haapasalo et al. und Van Winkelhoff et al. (131-133). Hashioka et al. und Gomes et al. konnten ebenfalls enge Korrelationen zwischen bestimmten Spezies und bestimmten Verlaufsformen apikaler Entzündungen feststellen (134, 135). Die Anzahl und Präsenz bestimmter Spezies scheint demnach - abgesehen von der aktuellen Abwehrlage des Wirtes - für den Verlauf einer periapikalen Entzündung ausschlaggebend zu sein.

Die sehr komplexen Wechselwirkungen sind bei weitem noch nicht erschöpfend erforscht. Durch neuere Nachweisverfahren mit PCR-DNA-Sonden können möglicherweise einige Fragestellungen detaillierter beantwortet werden als bisher. So konnten Conrad et al. und Gonçalves sowie Mouton erstmalig *Bacteroides forsythus* im Wurzelkanalsystem nachweisen, einen Keim, der bisher nur im Rahmen der marginalen Parodontitis isoliert wurde (136, 137). Außerdem ermöglichen diese Verfahren auch eine quantitative Erfassung von Mikroorganismen, die heikel in Isolierung und Kultivierung sind, z.B. *Porphyromonas endodontalis* (138). Vafaie et al. fanden durch DNA-Sonden-Nachweis in 50% der Fälle Spirochäten und in allen untersuchten Proben *Actinomyces* Arten (139), was als überraschend häufiges Vorkommen gesehen werden muss.

In letzter Zeit gewinnen Hefepilze insofern stärker an Bedeutung, als sie oft in therapieresistenten Läsionen gefunden werden (140-142). Watts et al. konnten jedoch auch in infizierten, nicht behandelten Wurzelkanälen mittels DNA-Sonden in 25% der Fälle *Candida albicans* isolieren (143).

Die Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem stellen aus therapeutischer Sicht ein Problem dar, da sie nicht nur in Haupt- und Seitenkanälen, sondern auch in den Dentintubuli beherbergt sind. Auch hier gibt es Unterschiede hinsichtlich der Penetrationstiefe und der Art des Keimes. Berkitten et al. konnten in einer *In-vitro*-Studie zeigen, dass *Prevotella intermedia* innerhalb von 20 Tagen nur etwa 26µm in die Dentintubuli eindrang, wohingegen *Streptococcus sanguis* in bis zu 380µm Tiefe gefunden wurde (144). Waltimo et al. demonstrierten die Besiedlung von

Dentintubuli in ihrer Gesamtlänge durch *Enterococcus faecalis* innerhalb von 1-5 Tagen, wohingegen verschiedene *Candida albicans* Spezies während einer Beobachtungszeit von insgesamt 30 Tagen nur etwa 30µm und eher unregelmäßig in die Tubuli eindringen (145). Während einige Autoren von Penetrationstiefen bis zu 1mm berichten (146, 147), konnten Andoh und Hoshino bis zu 2mm Eindringtiefe beobachten (107).

Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass sich möglicherweise Mikroorganismen im periapikalen Gewebe verbergen, das außer durch chirurgische Maßnahmen nicht erreichbar ist. In der Regel finden sich in vitalem Gewebe keine Mikroorganismen, da sie im Falle des Eindringens sofort von der Körperabwehr eliminiert werden (148, 13). In Exazerbationen, im Falle von Aktinomykosen oder bei Überinstrumentierung ist jedoch eine Präsenz von Bakterien nicht ungewöhnlich (149, 34). Chronische apikale Granulome wurden bisher als „steril“ betrachtet (150). Fukushima et al. konnten selbst in persistierenden apikalen Parodontitiden nach Wurzelkanalfüllung nur innerhalb des Wurzelkanals, in keinem der untersuchten Fälle jedoch im periapikalen Gewebe Mikroorganismen entdecken (151). Einige andere Autoren konnten jedoch Mikroorganismen im periapikalen Gewebe nachweisen (152-160). Dies könnte jedoch auf methodische Fehler zurück zu führen sein, denn es scheint nahezu unmöglich, unter sterilen Bedingungen Gewebeproben aus dem Munde zu entnehmen (34), ebenso ist allein die unmittelbare Nachbarschaft des stark infizierten Wurzelkanales zum periapikalen Gewebe bereits eine mögliche Quelle für eine Kontamination. Zudem geben manche der Autoren in einigen Fällen vor chirurgischer Eröffnung der apikalen Läsion das Vorliegen von Fisteln oder Vertikalfrakturen an (152, 155). Das Vorliegen einer Fistel oder einer Vertikalfraktur schließt jedoch sterile Verhältnisse apriori aus. Andere Autoren versuchten daher im Tierexperiment unter größtmöglicher Vorsicht die Wurzelspitze infizierter Zähne und das umgebende Gewebe als Blocksektion zu entnehmen und sich dann durch serielle Schnitte dem eigentlichen Ort des Interesses anzunähern. Es wurden immer Mikroorganismen im Wurzelkanal oder im Innern von Makrophagen, nicht jedoch im periapikalen Gewebe gefunden (161, 162). Zur endgültigen Klärung dieses umstrittenen Themas müssen noch weitere Untersuchungen mit verbesserten Methoden durchgeführt werden. Eingehende

Darstellungen zum Thema Mikrobiologie des Wurzelkanales können bei Dahlén und Haapasalo nachgelesen werden (163).

2.2 Desinfektion des Wurzelkanalsystems

Desinfektion ist definiert als gezielte (selektive) Keimabtötung mit dem Ziel, eine Übertragung von Infektionen durch unerwünschte Mikroorganismen zu verhindern (164), bzw. Abtötung, Hemmung oder Entfernung aller pathogenen Mikroben, die eine Infektion bewirken können (165). Eine Desinfektion kann (a) mechanisch, z.B. durch Scheuern oder Reiben, (b) physikalisch durch Strahlen (UV-Licht) oder Hitze sowie (c) chemisch durch Desinfektionsmittel durchgeführt werden. Die Wirkung der Desinfektionsmittel wird durch Proteinschädigung, Permeabilitätsschädigung der Zellmembran oder die Blockade von Enzymsystemen erzielt (164).

Das Problem einer Desinfektion des Wurzelkanalsystems besteht in der Präsenz vitaler Gewebe in unmittelbarer Nachbarschaft des Desinfektionsortes. Es wäre daher idealerweise ein Desinfektionsverfahren erforderlich, das pathogene Keime abtötet, Wirtszellen jedoch nicht beschädigt.

2.2.1 Mechanische Aufbereitung

Aus dem bisher Beschriebenen geht hervor, dass als Therapiekonzept im Falle einer apikalen Parodontitis oder deren Prävention die Elimination von Mikroorganismen im Vordergrund steht. Hierzu gibt es im Wesentlichen zwei Möglichkeiten: (a) Die mechanische Entfernung infizierten (Hart-)Gewebes und (b) die chemische Desinfektion. In jüngerer Zeit sind auch andere Verfahren vorgestellt worden, z.B. die Desinfektion mit Laser (166-168), hochfrequentem Strom (169) oder durch Kavitation (170-172).

Byström und Sundqvist untersuchten, inwieweit mechanische Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung in der Lage ist, die Anzahl der Mikroorganismen zu reduzieren (115). Sie fanden nach Bearbeitung bis zu einer Instrumentengröße ISO 40 zwar eine Reduktion von 10^2 - 10^3 Mikroorganismen, in keinem der Fälle gelang

jedoch durch Instrumentierung eine vollständige Keimelimination. In einer ähnlichen Studie wurde die Effektivität der mechanischen Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung oder in Kombination mit 0,5% Natriumhypochlorit untersucht (116). Auch hier waren nach Instrumentierung mit Kochsalzlösung noch alle Kanäle infiziert. Die Instrumentierung wurde in weiteren Sitzungen wiederholt, eine desinfizierende Zwischeneinlage wurde nicht appliziert. Zu Beginn der fünften Sitzung fanden sich noch in sieben von 15 Kanälen Mikroorganismen, in der Gruppe mit Natriumhypochlorit-Applikation waren dagegen nur noch 3 von 15 Kanälen infiziert. Ørstavik et al. untersuchten, ob die Größe der Masterfeile unter Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung einen Einfluss auf die Reduktion von Mikroorganismen im Wurzelkanal hat (173). In zwei von acht Kanälen, die mit Instrumenten zwischen ISO-Größe 45 und 80 aufbereitet waren, zeigte sich bakterielles Wachstum, während von den 15 Kanälen, die bis maximal ISO-Größe 40 aufbereitet worden waren, aus sechs Kanälen Mikroorganismen isoliert werden konnten. Obwohl der Unterschied nicht signifikant war, handelt es sich hier um eine erwähnenswerte Tendenz, die bei größerer Probenzahl möglicherweise aussagekräftiger wäre. Yared et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss der Masterfeilen-Größe auf die Reduktion von Mikroorganismen, wobei die Autoren allerdings 1%iges NaOCl als Spüllösung verwendeten (174). Sie konnten keinen signifikanten Unterschied in der Reduktion der Bakterienzahl feststellen. Dalton et al. verglichen bei gleicher Fragestellung die Instrumentierung mit Handinstrumenten mit der maschinellen Aufbereitung durch rotierende Nickel-Titaninstrumente (175). Sie verwendeten nur physiologische Kochsalzlösung als Spül- und Gleitmittel. Zwischen den beiden Aufbereitungssystemen fand sich kein signifikanter Unterschied in der Reduktion der Bakterienzahl. Zwischen der Keimzahl der Ausgangssituation und derjenigen nach dem ersten Instrumentieren war ein signifikanter Unterschied erkennbar, weiterhin reduzierten sich die Mikroorganismen signifikant mit zunehmender Größe der Masterfeile. Dies bestätigt die Tendenz der bei Ørstavik gefundenen Ergebnisse. Siqueira et al. fanden auch eine signifikante Verringerung von Mikroorganismen nach Instrumentierung ohne Zusatz desinfizierender Spüllösungen (176). Hierbei handelte es sich jedoch um ein *In-vitro*-Projekt, bei dem extrahierte Zähne für 24 h mit *E. faecalis* inkubiert worden

waren, bevor sie mechanisch bearbeitet wurden. Es ist fraglich, ob in diesem kurzen Zeitraum eine Besiedlung der Dentintubuli stattfinden konnte, wie sie *in vivo* in der Regel vorgefunden wird (85).

Die mechanische Aufbereitung kann also durchaus beträchtliche Mengen an Bakterien im Wurzelkanalsystem eliminieren, eine vollständige Desinfektion ist jedoch nicht gewährleistet.

2.2.2 Spüllösungen

Um die Desinfektionswirkung während der Aufbereitung zu verbessern, werden antimikrobielle Spüllösungen eingesetzt. Diese dienen zugleich dem Abtransport der beim Instrumentieren entstehenden Dentinspäne und als Gleitmittel für die Wurzelkanalinstrumente. Als Spüllösungen wurden bisher verschiedene Agenzien angewendet, wie z.B. Wasserstoffperoxid, Ethylalkohol, Phenolderivate, Schwermetallsalze, quarternäre Ammoniumverbindungen, Halogenverbindungen (177), oder Säuren wie z.B. Peressigsäure (178). Obwohl die meisten dieser Lösungen eine mehr oder weniger starke antimikrobielle Wirkung zeigen, hat sich Natriumhypochlorit (NaOCl) als Spüllösung überwiegend durchgesetzt.

2.2.2.1 Natriumhypochlorit

NaOCl wurde ursprünglich im Ersten Weltkrieg als Desinfektionslösung für Wunden eingesetzt (179, 180). Es zeigt neben seinen antimikrobiellen Eigenschaften die Fähigkeit, nekrotische Gewebe aufzulösen (181-185) (Abb. 5 a und b).

Dies ist um so wichtiger, als in der Endodontie durch die verzweigte Wurzelkanalmorphologie der Zähne nicht alle Areale des Wurzelkanalsystems mechanisch erreicht werden können (Abb. 6 und 7). Problematisch ist nur, dass NaOCl eine relativ lange Kontaktzeit benötigt, um eine ausreichende oder gar vollständige Auflösung nekrotischer Gewebe zu bewerkstelligen. Für etwa 6,5mg pulpaes Gewebe werden mit 1ml 2%igem NaOCl bei 37°C zwei bis zweieinhalb Stunden zur völligen Auflösung benötigt (183). Die Gewebe auflösende Eigenschaft

nimmt mit der Konzentration des NaOCl und der applizierten Menge zu (181, 186). Zu beachten ist jedoch, dass der Gewebe auflösende Effekt stark reduziert wird, wenn das Gewebe vorher durch protein-koagulierende Medikamente (z.B. Formokresol) verändert wurde. In einem solchen Fall muss die Konzentration zwei- bis dreimal höher gewählt werden (186). Eine Temperaturerhöhung einer 2,6%igen NaOCl-Lösung von Raumtemperatur (21°C) auf Körpertemperatur (37°C) bewirkt einen gesteigerten Gewebe auflösenden Effekt, der dem einer 5,2%igen NaOCl-Lösung bei Raumtemperatur entspricht. Wird jedoch 5,2%iges NaOCl erwärmt, so wird der ursprüngliche Effekt nicht verstärkt (187).

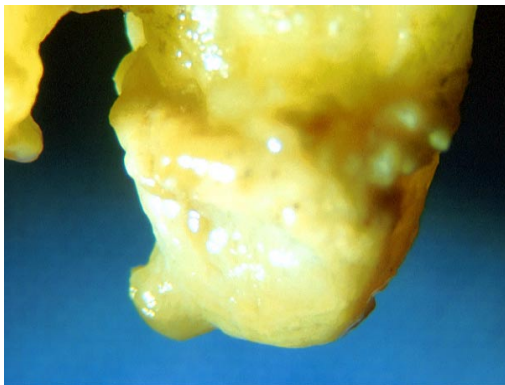


Abb. 5 a



Abb. 5 b

Abbildungen 5 a und b:

Darstellung des Gewebe auflösenden Effektes von NaOCl: Extrahierte Zahnwurzel mit anhängenden Geweberesten (Abb. 5 a), die ohne mechanische Einwirkung nach 30-minütiger Lagerung in ca. 50ml durch 2,5%iges NaOCl vollständig aufgelöst wurden (Abb. 5 b).

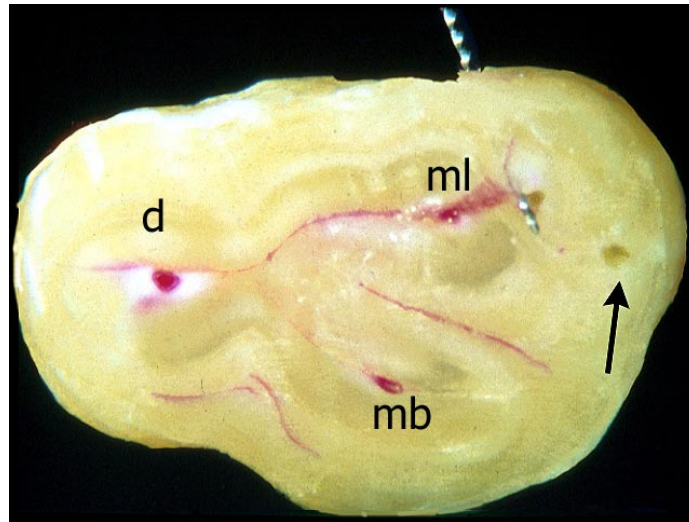


Abbildung 6:
Aufsicht auf den Querschnitt durch die fusionierten Wurzeln eines Unterkiefermolaren. Durch Farbstoff sind der distale (d) und die mesialen Hauptkanäle (ml, mb) eingefärbt. Es sind jedoch auch Anastomosen und akzessorische Kanäle erkennbar (Wurzelkanalinstrument, Pfeil).

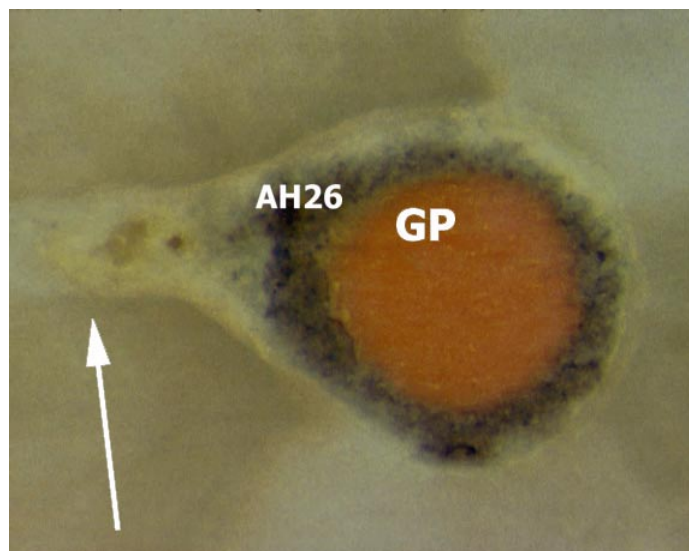


Abbildung 7:
Wurzelkanalfüllung mit Guttapercha (GP) und Sealer (AH26) im Querschnitt auf mittlerer Höhe einer Zahnwurzel. Links findet sich ein zufällig getroffener lateraler Kanal, der teilweise mit Sealer gefüllt ist (Pfeil).

Eine weitere günstige Eigenschaft des NaOCl ist seine Fähigkeit, Bakterienzellwandbestandteile, auch als Lipopolysaccharide (LPS) oder Endotoxine bezeichnet, zu neutralisieren bzw. zu inaktivieren (188, 189). Es ist bekannt, dass LPS entzündliche Reaktionen hervorrufen (25) und tierexperimentell sogar zur Lyse periapikalen Knochens führen können, wenn sie in den Wurzelkanal eingebracht werden (190). LPS werden bei der Vermehrung oder beim Tod von gramnegativen Mikroorganismen freigesetzt (191). Es ist daher denkbar, dass ein antibakteriell wirksames Agens zwar Mikroorganismen abtötet, dass jedoch die dadurch freigesetzten LPS eine Entzündung persistieren lassen.

Die Desinfektionskraft von NaOCl nimmt im Wurzelkanal von koronal nach apikal und von zentral nach peripher ab (192), was sicherlich darauf zurückzuführen sein dürfte, daß bedingt durch die konische Form des Wurzelkanales im koronalen und im zentralen Anteil bei Applikation von NaOCl mehr Volumen der Lösung vorliegt. Calas et al. untersuchten die Adhäsion von Mikroorganismen an mit Hypochlorit vorbehandelten Dentinproben im Vergleich zu Dentinproben, die mit Kochsalzlösung vorbehandelt worden waren. Sie fanden an den dem Natriumhypochlorit exponierten Proben signifikant weniger Mikroorganismen (193).

In vivo zeigte NaOCl in Kombination mit der mechanischen Aufbereitung eine deutliche Verbesserung der Keimreduktion im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung (116). Während die Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung bei Dalton et al. nur in 28% der Fälle keimfreie Kanäle erbrachte, erreichten Shuping et al. bei gleichem Studiendesign, jedoch mit 1,25%iger NaOCl-Lösung in 62% der Fälle keimfreie Wurzelkanäle (175, 194). Ähnliche Ergebnisse konnte auch Sjögren nach Aufbereitung mit NaOCl erzielen (66). Diese Daten zeigen, dass auf NaOCl aufgrund seiner unterstützend keimreduzierenden Wirkung bei der mechanischen Aufbereitung nicht verzichtet werden sollte.

Umstritten ist, welche NaOCl-Konzentration im Rahmen der Aufbereitung als Günstigste anzusehen ist. Je höher die Konzentration der Spüllösung ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass vitale Gewebe geschädigt werden (195). D'Arcangelo züchteten über zehn verschiedene endopathogene Keime an und gaben 1ml des des jeweiligen Inokulums zu 9ml NaOCl-Lösungen in diversen

Konzentrationen. Alle Lösungen zeigten vergleichbare starke antimikrobielle Wirkung (196). Diese Studie ermittelte zwar die Sensibilität bestimmter Keime gegen NaOCl, die Übertragbarkeit auf *In-vivo*-Verhältnisse ist jedoch fraglich, da die Komplexität und damit die Penetrierbarkeit des Wurzelkanalsystemes unberücksichtigt waren. Siqueira et al. instrumentierten extrahierte Zähne mit nekrotischem Endodont mit 1%igem, 2,5%igem und 5%igem NaOCl und konnten für alle Lösungen eine ähnlich starke Reduktion der Keimzahl feststellen, in keinem der Fälle konnte jedoch absolute Keimfreiheit erzielt werden (197). Ebenso beobachteten Seichter et al. für die Reduktion der Bakterienzahl keinen Unterschied bei Applikation von 0,9%igem oder 3%igem NaOCl, nachdem sie extrahierte Zähne mit *S. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* und *A. viscosus* inkubiert und chemomechanisch aufbereitet hatten (198). Auch Vahdaty et al. konnten in einem *In-vitro*-Experiment keinen Unterschied bezüglich der Desinfektionskraft verschieden stark konzentrierter NaOCl-Lösungen (0,2 und 2%) feststellen (199). Im Gegensatz zu den vier zuletzt zitierten Studien beobachteten Siqueira et al. in einem Agar-Diffusionstest eine signifikant größere Wachstums-Inhibition acht schwarzpigmentierender Spezies durch 2,5%iges oder 4%iges im Vergleich zu 0,5%igem NaOCl (200). In einem ähnlichen Experiment, jedoch mit anderem Keimspektrum, konnten Ayhan et al. diese Beobachtung bestätigen (201). Trotz dieser beiden zuletzt genannten Arbeiten kann davon ausgegangen werden, daß die antibakterielle Wirkung des NaOCl in verschiedenen Konzentration in etwa gleich ist. Dies konnte auch in einer der wenigen *In-vivo*-Studien von Byström et al. bestätigt werden. Die Autoren konnten nach Instrumentierung von Zähnen mit apikaler Parodontitis keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Reduktion der Bakterienzahl feststellen, wenn eine 0,5%ige und einer 5%ige NaOCl-Lösung eingesetzt wurde (202). Anders sieht die Betrachtung jedoch möglicherweise aus, wenn die *fungizide* Wirkung des NaOCl untersucht wird. D'Arcangelo et al. und Ferguson et al. konnten keinen Unterschied in der fungiziden Wirkung feststellen, wenn NaOCl in verschiedenen Konzentrationen appliziert wurde (196, 203). Sen et al. und Ayhan et al. beobachteten dagegen mit steigender Konzentration auch steigende fungizide Wirkung gegen *Candida* Spezies. Es fehlen jedoch diesbezüglich noch aussagekräftige *In-vivo*-Studien.

Eine 3–6%ige NaOCl-Lösung zeigt im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen einen wesentlich besseren desorptiven Effekt für Proteine, was letztenendes zu verschlechterten Lebens- und Adhäsionsbedingungen von Mikroorganismen führt (204). Interessant ist vielleicht noch der Aspekt, dass frisch angemischtes 5%iges NaOCl seine Gewebe auflösende Eigenschaft für etwa 10 Wochen beibehält, während eine 2,62%ige oder 1%ige Lösung nach ein bis zwei Wochen diese Eigenschaft verliert (205).

Cunningham und Joseph konnten in einem *In-vitro*-Experiment durch Erwärmung von 2,5%igem NaOCl von 22°C auf 37°C in signifikant kürzerer Zeit eine Elimination von Bakterien erzielen (206). Das so erwärmte NaOCl ist jedoch nur noch für vier Stunden stabil. Sjögren und Sundqvist untersuchten die antimikrobielle Wirkung von 0,5%igem NaOCl *in vivo* und verglichen hierbei die Aufbereitung mit Ultraschall oder Hand (207). Durch Ultraschallapplikation waren nur noch in 29% der Fälle Mikroorganismen nachweisbar, wohingegen bei Handaufbereitung signifikant mehr, nämlich in 55% der Fälle Bakterien isolierbar waren. Dies ist möglicherweise auf die Erwärmung des NaOCl durch Ultraschallanwendung zurückzuführen, denn der sogenannte Kavitationseffekt durch Ultraschallapplikation ist nach Ahmad im Wurzelkanal nicht von klinischer Relevanz (208).

Die alternierende Spülung mit H₂O₂ und NaOCl, wie sie im deutschsprachigen Raum noch häufig durchgeführt wird, bringt gegenüber der alleinigen Applikation von NaOCl keine relevanten Vorteile. H₂O₂ alleine ist mäßig antibakteriell wirksam (209) und führt angeblich durch den „schäumenden“ Effekt zu einer verbesserten Entfernung von Debris (210). Svec und Harrison konnten im apikalen Wurzelkanalanteil eine verbesserte Reinigung beobachten, wenn H₂O₂ und NaOCl bei der Instrumentierung alternierend eingesetzt wurden im Gegensatz zur Applikation von Kochsalzlösung (211). Leider testeten die Autoren nicht, inwieweit NaOCl alleine ähnliche Ergebnisse erzielen kann. Die Verwendung beider Spüllösungen führt zu einer Reaktion, aus der Kochsalz, Wasser und Sauerstoff entstehen ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NaOCl} \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NaCl} + \text{O}_2$). Dass *in vivo* nach Aufbereitung weniger Schmerzsensationen registriert werden, wenn beide Spüllösungen gemeinsam angewendet wurden im Vergleich zur alleinigen Applikation von NaOCl (212), könnte

daraus resultieren, dass sich die Lösungen im Wurzelkanal neutralisieren. Die bakterizide Wirkung dieser Wirkstoffkombination ist jedoch nicht gesichert und der Gewebe auflösende Effekt des NaOCl wird durch Zugabe von H_2O_2 nahezu vollständig aufgehoben (186).

In manchen Punkten erscheinen die Ergebnisse der zitierten Studien bezüglich NaOCl durchaus widersprüchlich. Dies liegt sicherlich an der Unterschiedlichkeit der Untersuchungsmethodiken, Lösungskonzentrationen, Expositionszeiten und der Auswahl verschieden resistenter Mikroorganismen. Es kann jedoch zusammenfassend gesagt werden, daß NaOCl eine gute, nicht jedoch vollständig desinfizierende Wirkung zugesprochen werden kann, die einen mit der Konzentration steigenden Gewebe auflösenden Effekt besitzt und in der Lage ist, bakterielle Endotoxine zu neutralisieren. Damit ist es nach wie vor ein geeignetes Agens zur Unterstützung der mechanischen Aufbereitung.

2.2.2.2 Chlorhexidin

In jüngerer Zeit gerät Chlorhexidin (CHX) immer stärker ins Blickfeld der Forschung. CHX wurde 1954 von Davies et al. als Desinfektionsmittel eingeführt und wird in vielen Bereichen der Medizin, u.a. auch zur Haut- und Händedesinfektion angewendet (213). Auch im Bereich der Kosmetik und Pharmazie, zur Konservierung von Cremes, Deodorants, Augentropfen oder Wundpräparaten findet CHX Anwendung. 1970 zeigten Löe et al. erstmalig, dass durch die zweimal tägliche Anwendung einer 0,2%igen CHX Lösung eine Plaquebildung und damit gleichzeitig die Ausbildung einer Gingivitis verhindert werden konnte (214).

CHX gehört zu der Gruppe der Bisguanide und liegt in reiner Form als weißes geruchloses Pulver vor. Es besitzt kationischen Charakter. Die freie Base ist in Wasser bei 20°C nur zu 0,08% löslich, als Diacetat beträgt die Löslichkeit 1,9%, als Digluconat jedoch >50% (213). Winrow untersuchte, auf welchem Wege CHX nach oraler Verabreichung ausgeschieden wird und stellte fest, dass es beim Menschen zu 81,9% und bei der Ratte zu 99,5% über den Stuhl ausgeschieden wird (215). Deshalb wird CHX in der Zahnmedizin als Digluconat verwendet. CHX wirkt in

Konzentrationen von ca. 100ppm bakterizid und besitzt noch bei Konzentrationen von ca. 0,19ppm bakteriostatische Eigenschaften (216). Das Spektrum der auf CHX sensitiven Mikroorganismen erstreckt sich über eine breite Spanne grampositiver und gramnegativer Bakterien, von denen jedoch die grampositiven sensibler zu sein scheinen als einige gramnegative, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (216, 217). Durch seinen kationischen Charakter hat es die Fähigkeit, sich an alle negativ geladenen Flächen anzulagern, wodurch es zu einer Art Reservoirbildung kommt. Diese Flächen können Speichelmuzine, Bakterienzellen, Pellicel oder Hydroxylapatit sein (218-221). Die Bindung an diese Flächen kommt über anionische Gruppen wie Phosphat- Sulfat- oder Carboxylgruppen zustande (222). CHX besitzt eine starke, jedoch pH-abhängige Bindung an Serumalbumin, in dessen Gegenwart auch die antibakteriellen Eigenschaften abnehmen (216). Während Bassetti und Kallenberger nach CHX-Applikation eine verzögerte Wundheilung in Mukosa/Knochenläsionen beobachteten, fanden Saatman et al., Hirst et al., Sanchiez et al., Brennan und Leaper und Brennan et al. keine Wundheilungsstörungen nach CHX-Applikation, allerdings war bei den zuletzt zitierten Studien kein knöchernes Gewebe involviert (223-228). Die hohe antimikrobielle Effektivität, seine geringe Toxizität und seine ausgeprägte Substantivität legen nahe, CHX als Desinfektionslösung im Wurzelkanal zu applizieren.

Eine Art der Bestimmung der antimikrobiellen Eigenschaften von CHX ist die Hemmhofbestimmung nach Auflegen CHX-getränkter Papierscheiben auf bakteriell inokulierte Agar-Platten oder nach Einbringen von Test-Lösungen in vorgestanzte und mit Bakterien inokulierte Agar-Platten. Hierbei konnten Barbosa et al. keine signifikant unterschiedliche Größe der Hemmhöfe bei Aufbringen 0,12%iger, 0,2%iger CHX-Lösung oder einer Kamphermonochlorphenol-Lösung (CMCP) feststellen (229). Siqueira et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen (230), wobei bei ihnen zusätzlich Ca(OH)_2 getestet wurde, das sich außer in Kombination mit CMCP als ineffektiv herausstellte. In einer weiteren Studie mit ähnlichem Design verglichen die Autoren die antimikrobiellen Eigenschaften verschieden konzentrierter NaOCl- und CHX-Lösungen mit denen von 10%iger Zitronensäure und 17%igem EDTA (200). Der antibakterielle Effekt nahm von 4%igem NaOCl über 2,5%iges NaOCl, 2%iges CHX, 0,2%iges CHX, EDTA, Zitronensäure bis zum 0,5%igen NaOCl ab. Die

4%ige NaOCl-Lösung war jedoch abgesehen von 2%igem NaOCl-Lösung allen anderen Testsubstanzen signifikant überlegen. Auch Ayhan et al. konnten eine signifikante Überlegenheit von 5,25%igem NaOCl gegenüber einer 2,0%igen CHX-Lösung beobachten (201). In einer Studie von D'Arcangelo et al., in der 1ml bakterieller Bouillon mit 9ml diverser Testlösungen vermischt und bebrütet wurden, zeigten sich alle getesteten Agenzien, darunter 0,1%iges und 0,5%iges CHX und 0,5-5%iges NaOCl, gleichermaßen antibakteriell wirksam. Wie bereits früher bemerkt, ist die Relevanz dieser Art von Studien in Frage zu stellen, da die Problematik des Wurzelkanals mit seinen Verzweigungen und der Möglichkeit von ins Dentin penetrierten Mikroorganismen unberücksichtigt bleibt.

Aussagekräftiger sind daher sicherlich *In-vitro*-Studien, die entweder frisch extrahierte Zähne mit nekrotischem, infiziertem Endodont verwendeten oder frisch extrahierte Zähne mit endopathogenen Mikroorganismen inokulierten und anhand dieser die Effektivität der Desinfektionslösungen untersuchten. Delany beobachtete mit diesem Studiendesign bereits 1982 die antimikrobielle Überlegenheit einer 0,2%igen CHX- gegenüber physiologischer Kochsalzlösung (231). Beim Vergleich zwischen CHX und NaOCl konnten White et al., Seichter et al. und Jeansonne et al. keine Unterschiede feststellen (198, 232, 233).

Einige Autoren verwendeten eine erstmals von Ørstavik und Haapasalo vorgestellte Methodik (234) in mehr oder weniger modifizierter Form. Hierbei werden humane oder Rinderzähne oder deren Querschnitte mit endopathogenen Keimen inokuliert und zwischen 12 Stunden und 21 Tagen bebrütet, um eine bakterielle Penetration in die Dentintubuli zu gewährleisten. Danach werden die Testsubstanzen appliziert. Mit Rosenbohrern mit jeweils zunehmendem Durchmesser werden von innen nach außen definierte Dentinschichten abgetragen, die anschließend mit den Testlösungen in Kontakt gebracht, oder wenn dies bereits vor Abtragen des Dentins geschehen war, in Nährlösungen bebrütet werden. Hieraus wiederum wird die Anzahl von Bakterien u.a. durch Bestimmung der optischen Dichte ermittelt. Ørstavik und Haapasalo konnten beim Vergleich zwischen 0,2%igem CHX und 5,25%igem NaOCl keine Unterschiede bezüglich der Tiefe der Desinfektion in den Dentintubuli feststellen, Iod-Kaliumiodid war jedoch in der Lage,

noch in wesentlich tieferen Schichten Keime zu eliminieren, während EDTA keinerlei antimikrobielle Wirkung zeigte (234). Auch Vahdaty et al. und Heling et al. fanden mit dieser Testmethode keine Unterschiede zwischen unterschiedlich konzentrierten NaOCl und CHX-Lösungen (199, 235). Komorowski et al. untersuchten die Wirksamkeit von 0,2%igem und 2,5%igem NaOCl gegen *Enterococcus faecalis*, einen Keim, der als Problemkeim gilt (236). Er wurde des öfteren in Wurzelkanälen mit persistierenden apikalen Parodontitiden nach erfolgter Wurzelkanalbehandlung gefunden (122-124). Komorowski et al. beobachteten zwar keine Unterschiede zwischen einer 2,5%igen NaOCl-Lösung und einer 0,2%igen CHX-Lösung bezüglich der antimikrobiellen Wirkung bei Applikation der Testlösungen für fünf Minuten. Bei einer Einwirkzeit von sieben Tagen hingegen zeigte sich CHX im Gegensatz zu NaOCl signifikant überlegen (236).

Leonardo et al. und White et al. konnten *in vitro* auch für den Wurzelkanal einen Residualeffekt von CHX nachweisen (237, 238), Jung et al. obturierten Wurzelkanäle nach 5-minütiger CHX- oder NaOCl-Exposition und konnten in den mit CHX-behandelten Proben für 35 Tage keine bakterielle Passage beobachten, während die mit NaOCl behandelten Wurzeln bereits nach 24 Stunden penetriert waren (239). Roach et al. legten diverse medikamentöse Einlagen in unverschlossene Wurzelkanäle, darunter Ca(OH)_2 , 1%iges CHX-Gel und eine kalziumhydroxidhaltige Guttaperchaspitze, um anschließend die bakterielle Penetration durch diese Wurzelkanäle zu testen. Das CHX-Gel war zwar der Kalziumhydroxid-Guttapercha-Spitze signifikant überlegen, konnte aber die bakterielle Penetration nicht so gut verhindern wie Ca(OH)_2 -Paste (240). Die meisten der bisher zitierten Studien, die sich mit CHX auseinandersetzten, konnten keinen konzentrationsabhängigen Unterschied der antimikrobiellen Wirkung beim Einsatz von Lösungen zwischen 0,1% und 2% beobachten. Gomes et al. stellten jedoch eine signifikant schnellere Keimelimination bei 2%iger im Vergleich zu 0,2%iger CHX-Lösung fest (241). Auch White et al. konnten eine signifikant bessere Reduktion von Mikroorganismen bei 2%igem im Vergleich zu 0,12%igem CHX demonstrieren (237).

Sen et al. beobachteten für eine 0,12%ige CHX-Lösung zwar einen fungiziden

Effekt, der jedoch erst eintrat, wenn die Kontaktzeit >1h war (242). Eine fungizide Wirkung des CHX konnte auch durch andere Studien bestätigt werden (243, 201, 196, 203).

In diversen *In-vivo*-Studien wurde CHX allein oder im Vergleich zu CMCP, NaOCl oder $\text{Ca}(\text{OH})_2$ getestet. So untersuchten Klimm et al. die Ausheilung periapikaler Läsionen nach Aufbereitung und mehrfacher Spülung mit CHX ohne anschließende Einlage (244). Die Autoren konnten in 60% der Fälle nach 6-40 Monaten eine vollständige Knochenregeneration feststellen und in 24% der Fälle wurde nach 3-8 Monaten eine Verkleinerung der Läsionen beobachtet. Leonardo et al. bereiteten ebenfalls *in vivo* Zähne mit nekrotischem Endodont mit 2%iger CHX-Lösung auf und untersuchten die Zähne vor und 48 Stunden nach Aufbereitung auf nachweisbare Mikroorganismen (238). Von 18 Zähnen mit isolierbaren Keimen konnten zwei Tage nach CHX-Applikation nur noch in 3 Zähnen anaerobe Keime nachgewiesen werden. Die Zahl der *Streptococcus-mutans*-Kolonien war in allen Fällen auf 0 reduziert. Ringel et al. bereiteten in ähnlicher Weise 60 Zähne auf, jedoch verglichen sie 0,2%ige CHX-Lösung mit 2,5%iger NaOCl-Lösung (245). Die Autoren untersuchten hierbei, wieviele Sitzungen nötig waren, bis alle Wurzelkanäle nur durch Aufbereitung und Spülung keine Bakterien mehr aufwiesen. Für beide Lösungen mußte eine ähnliche Anzahl von Sitzungen anberaumt werden. Während jedoch in den mit NaOCl behandelten Zähnen in elf Fällen nach bereits erreichter Keimfreiheit wieder Wachstum beobachtet wurde, konnte dies in den durch CHX behandelten Zähnen in 24 Fällen festgestellt werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Die Ergebnisse dieser Studie stellen somit den dem CHX zugeschriebenen Residualeffekt in Frage. In einer weiteren Studie von Kuruvilla und Kamath wurden ebenfalls die antimikrobiellen Eigenschaften von CHX und NaOCl *in vivo* verglichen (246). In Zähnen, die mit NaOCl gespült wurden, konnten in 3 von 10 Fällen keimfreie Bedingungen geschaffen werden. 4 von 10 waren es in den mit CHX behandelten und 6 von 10 Fällen in einer weiteren Gruppe, in der mit einer Kombination aus NaOCl und CHX gespült wurde. Die letzte Gruppe war hierbei signifikant effektiver als die erste. Leider untersuchten die Autoren nicht, inwieweit diese Mischung der beiden Lösungen in der Lage ist, nekrotische Gewebe aufzulösen. Barbosa et al. instrumentierten zur Bestimmung der antimikrobiellen

Wirkung verschiedener Substanzen Zähne mit nekrotischem Endodont *in vivo* und legten anschließend CPCM, Ca(OH)_2 oder 0,12%iges CHX ein (229). Die Autoren konnten keinen signifikanten Unterschied in der Desinfektionswirkung der eingelegten Medikamente feststellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CHX in seiner antibakteriellen und fungiziden Wirkung in keiner der Studien im Vergleich zu NaOCl überlegen war. NaOI dagegen schnitt bezüglich seiner Desinfektionskraft in einigen wenigen Studien zumindest in hohen Konzentrationen (4-5%) signifikant besser ab. Die meisten Studien wiesen ebenbürtige Resultate zwischen NaOCl und CHX auf. Tendenziell scheint eine höhere Konzentration beider Lösungen auch zu einer effektiveren Keimelimination zu führen. CHX kann also bezüglich der antimikrobiellen Eigenschaften durchaus mit NaOCl verglichen werden, wobei vor allem seine geringe Toxizität für den Wirt überzeugt (247, 248). CHX vermag jedoch nicht - wie NaOCl - Endotoxine zu neutralisieren (249). Bisher konnte auch noch kein Gewebe auflösender Effekt von CHX nachgewiesen werden. Aus der bisherigen Literaturrecherche kann daher der Schluß gezogen werden, dass auf NaOCl als Spüllösung nicht verzichtet werden sollte, CHX ist als zusätzliche oder Spüllösung der zweiten Wahl zu sehen.

2.2.3 Medikamentöse Zwischeneinlagen

Da bei mechanischer Aufbereitung selbst mit Unterstützung einer Desinfektionslösung keine absolute Keimfreiheit erreicht werden kann, ist es naheliegend, dies durch eine intermediäre desinfizierende Einlage mit längerer Expositionszeit zu versuchen. Auch bei diesen medikamentösen Zwischeneinlagen gibt es - wie bei den Spüllösungen - eine reiche Vielfalt zur Verfügung stehender Substanzen und Wirkstoffe. Von ihnen seien hier nur einige wie Formokresol, Campherparachlorphenol (CMCP), Metacresylacetat, Eugenol, Glutaraldehyd, Iod-Kaliumiodid, Kalziumhydroxid und zahlreiche lokale Antibiotika genannt.

In einer *In-vivo*-Studie konnten Barbosa et al. keinen Unterschied der Desinfektionskraft zwischen CMCP-, Ca(OH)_2 - oder 0,12%iger CHX-Einlage feststellen (229). Im Gegensatz dazu stellten Byström et al. eine Überlegenheit von

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ gegenüber Phenolderivaten fest (250). Sie verglichen *in vivo* CMCP und Kampferphenol (KP) mit Kalziumhydroxid als medikamentöse Einlage. In den Zähnen, die mit Kalziumhydroxid gefüllt waren, konnten die Autoren in einem von 30 Kanälen noch Keime nachweisen, jedoch <100 CFU. In den mit CMCP oder KP gefüllten Zähnen waren zehn von 30 Kanälen noch positiv, mit bis zu $1,5 \times 10^5$ CFUs. Phenolderivate zeigen nur eine kurze Aktionszeit. Messer und Chen markierten CMCP mit ^{14}C -Atomen und beobachteten, dass es innerhalb von 24 Stunden nach Einlage in die Pulpakammer nur noch zu 10% vorhanden war (251). Fager und Messer untersuchten ebenfalls die Diffusion von CMCP aus der Pulpakammer (252). Bereits nach 30 Minuten konnten radioaktive Partikel im Blut, nach 2 Stunden im Urin nachgewiesen werden. Etwa 50% der Gesamtmenge waren nach 24 Stunden aus den Zähnen diffundiert und bis zu 20% bereits über den Urin ausgeschieden. In einer weiteren Studie untersuchten Messer und Feigal den zytotoxischen Effekt im Vergleich zu den antibakteriellen Eigenschaften von CMCP (252). Die Autoren schätzen die Toxizität zu hoch und die antibakteriellen Eigenschaften zu niedrig ein, als dass das Medikament als Einlage empfohlen werden könne (253). Eine nur mäßige antimikrobielle Wirkung an extrahierten infizierten Zähnen konnte auch Akpata feststellen (254). Georgopoulou et al. isolierten anaerobe Mikroorganismen aus Wurzelkanälen, kultivierten diese und testeten an ihnen die antimikrobiellen Eigenschaften von Paramonochlorphenol und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (255). Die Autoren stellten eine klare Überlegenheit von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gegenüber dem Phenolderivat fest. Siqueira et al. beschickten aufbereitete Wurzelkanäle mit CMCP, Kalziumhydroxid oder einer CMCP/Kalziumhydroxid/Glyzerin-Mischung und untersuchten, wie lange es dauert, bis die Wurzelkanäle von koronal nach apikal durch Speichelbakterien penetriert wurden (256). In der CMCP-Gruppe konnten nach 2-13 Tagen Bakterien am Apex nachgewiesen werden, in den beiden anderen Gruppen, die Kalziumhydroxid enthielten, dauerte die bakterielle Penetration 4-34 Tage. Der Unterschied war statistisch signifikant.

Iod-Kaliumiodid wurde hinsichtlich seiner antimikrobiellen Wirksamkeit von Safavi et al. *in vivo* mit Kalziumhydroxid verglichen (257). Die Autoren instrumentierten die Kanäle und legten so lange wiederholt entweder Kalziumhydroxid, Iod-Kaliumiodid oder kein Medikament ein, bis sie keine Kulturen

mehr gewinnen konnten. Danach wurde untersucht, in wie vielen Fällen ein Rezidiv auftrat. Während sich die Iod-Kaliumiodid-Gruppe nicht signifikant von der Gruppe ohne medikamentöse Einlage unterschied, konnten in den mit Kalziumhydroxid versorgten Zähnen signifikant weniger positive Kulturen nachgewiesen werden.

2.2.3.1 Kalziumhydroxid

Als am weitesten verbreitetes intrakanaläres Medikament kann heutzutage Kalziumhydroxid (Ca(OH)_2) betrachtet werden. Bereits 1920 setzte Hermann die Paste im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung ein (258). Ca(OH)_2 hat als pastöses Gemisch einen pH-Wert von etwa 12,5 und dadurch eine stark antibakterielle Wirkung. Tronstad et al. konnten nach vierwöchiger Ca(OH)_2 -Einlage nachweisen, dass der pH-Wert selbst in den peripheren Anteilen des Wurzelkanales erhöht war (259). Während der pH-Wert in den nicht vorbehandelten Kontrollzähnen in der Peripherie zwischen 6,4 und 7,0 lag, konnte für die Ca(OH)_2 -Zähne ein pH-Wert von 8,0–10,0 ermittelt werden. Das unmittelbar an den Wurzelkanal angrenzende Dentin wies einen pH-Wert von 11,1–12,2 auf. Das Medikament wird nicht nur zur Desinfektion im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung eingesetzt sondern u.a. auch

- zur direkten Überkappung oder der Amputation der exponierten Pulpa (260, 261, 18, 262-264, 20, 265-267)
- nach Perforationen des Wurzelkanals (268, 269) sowie
- zur Apexifizierung der Wurzelspitze nach Trauma (270-278) (Abb. 8 a und b).

Die dabei einsetzende Hartgewebekonstruktion ist in erster Linie auf die antibakterielle Wirkung zurückzuführen. Selbst als pulpa-toxisch geltende Materialien - jedoch nur unter Ausschluss von Mikroorganismen - können zu einer Hartgewebekonstruktion führen, wie Cox et al. demonstrieren konnten (21-23, 279). Die Annahme, dass das für die Hartgewebekonstruktion benötigte Kalzium aus dem Ca(OH)_2 stamme, wurde inzwischen widerlegt (280), offensichtlich stammt es aus dem Blut (281). Freeman et al. untersuchten, inwieweit Kalziumhydroxid, Bariumhydroxid oder Tetracyclin einen Einfluss auf die Hartgewebekonstruktion hat (282). Nachdem sie im Rattenfemur Verletzungen gesetzt hatten, infundierten die Autoren je eine der genannten Lösungen. Bei den mit Ca(OH)_2 infundierten Tieren beobachteten die

Autoren eine vollständigere Heilung der Knochenwunde als bei den Tieren, bei denen andere Lösungen infundiert worden waren. Auch Hanlon et al. untersuchten das osteogene Potenzial verschiedener Biomaterialien. Sie verwendeten mineralisches Trioxidaggreagat (MTA), Ca(OH)_2 , Kalziumsulfat, Kalziumphosphat und Hydroxylapatit. Alle Kalzium enthaltenden Materialien zeigten eine deutlich bessere Mineralisation im Vergleich zu den Kontrollgruppen (283).

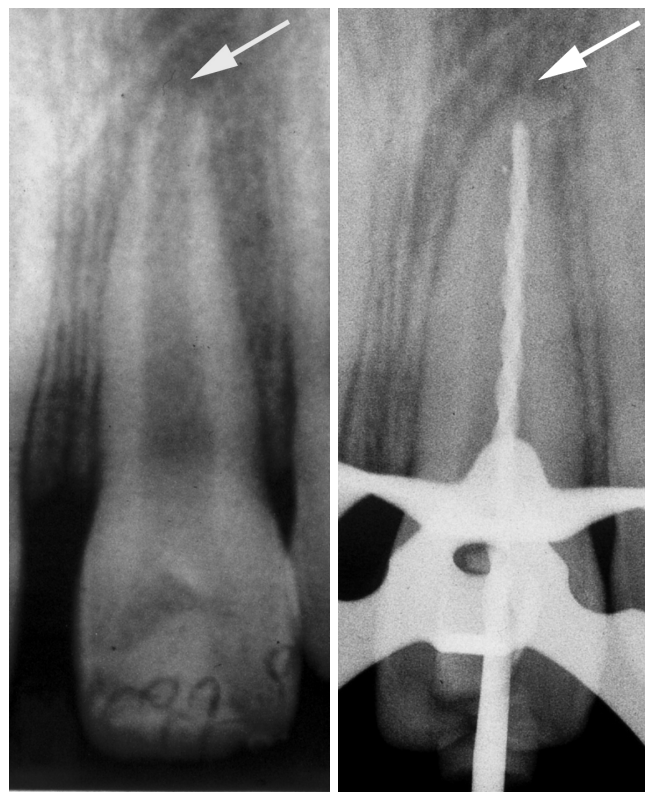


Abb. 8 a

Abb. 8 b

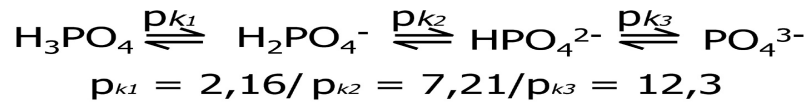
Abbildungen 8 a und b:

Beispiel für die Apexifizierung eines Zahnes mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum: Radiologische Darstellung eines traumatisierten devitalen Frontzahnes (21) mit offenem Apex (Pfeil, Abb. 8 a). Nach einjähriger Einlage von Ca(OH)_2 ist die Öffnung des Apex mit Zahnhartsubstanz verschlossen (Pfeil, Abb. 8b).

Ebenso wie NaOCl ist $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in der Lage, nekrotische Gewebe aufzulösen (182, 183, 185). Türkün und Cengiz konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung nekrotischen Gewebes mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zu seiner verbesserten Löslichkeit in 0,5%igem NaOCl führt (185). Auch Wadachi et al. untersuchten die Gewebe auflösenden Eigenschaften von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und NaOCl (284). $\text{Ca}(\text{OH})_2$ vermochte bei siebentägiger Applikation signifikant mehr Gewebe aufzulösen als bei ein- oder dreitägiger Applikation. 6%iges NaOCl vermochte nach 30 oder 60 Sekunden signifikant mehr Gewebe aufzulösen als nach 15 Sekunden. Die Kombination von NaOCl und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ war wiederum signifikant besser in der Gewebeauflösung als die Applikation beider Agenzien alleine. Diese Beobachtungen konnten von Hasselgren et al. bestätigt werden (182).

Sjögren et al. verglichen die antibakteriellen Eigenschaften einer zehnminütigen mit denen einer siebentägigen $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Einlage *in vivo* (285). Die zehnminütige Einlage brachte keine Verbesserung im Vergleich zur Aufbereitung mit 0,5%igem NaOCl, während die Applikation von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ für eine Woche zu einer Keimfreiheit in allen Fällen führte. In den für eine Woche mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ vorbehandelten Zähnen konnten selbst 1-5 Wochen nach Entnahme des $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und bei ungefülltem Wurzelkanal keine Bakterien mehr isoliert werden. Nerwich et al. fanden möglicherweise die Erklärung für die erforderliche Langzeitexposition mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (286): Die Autoren applizierten $\text{Ca}(\text{OH})_2$ für vier Wochen in Wurzelkanäle und maßen kontinuierlich den pH-Wert zervikal und am Apex bzw. zentral und in der Wurzelperipherie. Der pH-Wert stieg innerhalb von Stunden im zentralen Dentin auf 10,8 (zervikal) und 9,7 (apikal). Es dauerte ein bis sieben Tage, bis der pH-Wert an der Wurzeloberfläche zu steigen begann, wo nach zwei Wochen ein pH-Wert von 9,3 (zervikal) und 9,0 (apikal) erreicht wurde. Die Hydroxyl-Ionen diffundierten hierbei zervikal schneller als apikal. Dies mag zum einen mit dem zervikal größeren Lumen und damit der größeren Menge verfügbarer Hydroxyl-Ionen zusammenhängen, zum anderen mit der apikal stärkeren Sklerosierung des Dentins, die möglicherweise eine geringere Diffusion zulässt. Hydroxylapatit als Bestandteil von Schmelz und Dentin ($\text{Ca}_{10}^{2+}(\text{PO}_4)_6^{3-}(\text{OH})_2^-$) enthält in seiner reinen Form ausschließlich tertiäres Phosphat (PO_4^{3-}). Biologischer Apatit enthält vor allem aufgrund der pH-Verhältnisse in der Mundhöhle jedoch neben dem tertiären

Phosphat auch sekundäres (HPO_4^{2-}) Phosphat, entsprechend der drei Dissoziationsstufen der Phosphorsäure (287).



Daraus wird ersichtlich, dass der Apatit des Dentins sowohl gegenüber Säuren (Protonierung des sekundären und tertiären Phosphats) als auch Basen (Deprotonierung des sekundären Phosphats) eine gute Pufferwirkung besitzt. Aus diesem Grund wird vermutlich für $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eine längere Expositionszeit benötigt, um einen antimikrobiell wirksamen pH-Anstieg in allen Wurzelsegmenten zu erzielen. Molander et al. konnten *in vivo* keine Verbesserung der antimikrobiellen Eigenschaften feststellen, wenn $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nicht über sieben Tage, sondern über zwei Monate appliziert wurde (288). Ørstavik und Haapasalo beobachteten in ihrer *In-vitro*-Studie, dass mit *E. faecalis* infiziertes Dentin eine mindestens zehntägige $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Exposition benötigt, um die Keime abzutöten (234). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine mindestens einwöchige $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Einlage notwendig zu sein scheint, um eine suffiziente antimikrobielle Wirkung zu erzielen.

Inwieweit ein $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Einlage einen Einfluss auf die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen hat, ist weitgehend ungeklärt. Während Porkaew et al. und Holland et al. die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen *in vitro* mit und ohne vorherige $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Einlage untersuchten und herausfanden, dass die Dichtigkeit signifikant verbessert wurde, wenn eine vorherige $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Einlage erfolgt war (289, 290), konnten Kontakiotis et al. zeigen, dass es sich hierbei möglicherweise um einen methodischen Fehler handelte (291). Kontakiotis et al. verglichen wurzelkanalgefüllte Zähne mit und ohne vorherige $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Einlage, indem sie die von Porkaew et al. und Holland et al. applizierte Methode und ein Fluid-Transport-Modell anwendeten. Wie die Autoren vor ihnen, fanden sie mit der ersten Methode mit Methylenblau als Indikator einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, während mit dem Fluid-Transport-Modell kein signifikanter Unterschied erkennbar wurde. Es ist nicht gesichert, ob das Fluid-Transport-Modell ein zuverlässigerer Indikator zur Feststellung der Penetrierbarkeit von Wurzelkanalfüllungen ist. Für Methylenblau konnte von der die erste Methode

kritisierenden Forschergruppe festgestellt werden, dass es sich bei 24-stündigem Kontakt mit Ca(OH)_2 entfärbt (292). Dies würde die Applikation von Methylenblau als Penetrationsindikator in der Tat fraglich machen. Erstaunlicherweise benutzten Lage-Marques et al. eine Mischung aus Ca(OH)_2 und Methylenblau für ein anderes Experiment (293). Die Autoren konnten hierbei den Farbstoff noch nach 14 Tagen differenziert erkennen.

In letzter Zeit rücken einige Problemkeime immer stärker in den Mittelpunkt des Interesses, darunter auch *Enterococcus faecalis*. Immer wieder wurde dieser Keim mit therapieresistenten Fällen assoziiert (294-297, 102). Er scheint eine gewisse Resistenz gegen Ca(OH)_2 zu zeigen (250, 146). Estrela et al. untersuchten *in vitro* die antibakterielle Wirkung von Ca(OH)_2 gegen einige andere problematische Keime, wobei sie diese als Reinkultur und Mischkultur prüften. Während die Autoren in einem ersten Experiment nach 72-stündiger Ca(OH)_2 -Exposition kein Wachstum mehr beobachteten (298), fanden sie in einem zweiten Experiment selbst nach sieben Tagen Exposition noch Wachstum (299). Hierbei handelte es sich jedoch teilweise um andere Spezies, namentlich *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa*. Waltimo et al. untersuchten 26 *Candida* Subspezies und *E. faecalis* auf ihre Resistenz gegen Ca(OH)_2 (300). Verglichen mit *E. faecalis* zeigten die *Candida* Subspezies eine gleiche oder höhere Resistenz gegen Ca(OH)_2 . Es wurden 16 h Expositionszeit benötigt, um 99,9% aller Keime zu eliminieren. Im Gegensatz dazu zeigten Barbosa et al., dass mit einem durch Detergenzien modifizierten Ca(OH)_2 eine Expositionszeit von fünf Minuten ausreichte, um *Candida* Spezies abzutöten (301). Ferguson et al. untersuchten die fungizide Wirkung verschiedener Desinfektionslösungen und von Ca(OH)_2 (203). Nach 48-stündiger Exposition erwiesen sich NaOCl, H_2O_2 und Chlorhexidin selbst in starken Verdünnungen als fungizid, während Ca(OH)_2 nur in pastöser Form und in direktem Kontakt mit *C. albicans* eine fungizide Eigenschaft entwickelte.

Wie effektiv Ca(OH)_2 im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung ist, konnte in einigen *In-vivo*-Studien gezeigt werden. Ørstavik et al. untersuchten den Effekt von Aufbereitung und Ca(OH)_2 -Einlage in Zähnen mit infiziertem Endodont (173). Während nach dem Instrumentieren in 61% der Zähne noch Mikroorganismen

nachgewiesen werden konnten, fanden sich nach Ca(OH)_2 -Einlage nur noch in 35% der Fälle Mikroorganismen. Yared et al. beobachteten *in vivo* nach Ca(OH)_2 -Einlage in keinem von 60 infizierten Wurzelkanälen quantifizierbare Mengen von Mikroorganismen, während sie diese nach der Aufbereitung - also vor Ca(OH)_2 -Einlage - noch in 48% der Fälle nachweisen konnten (174). Katebzadeh et al. wollten herausfinden, inwieweit eine Ca(OH)_2 -Einlage ohne Aufbereitung und desinfizierende Spüllösung die periapikalen Gewebe nach Wurzelkanalfüllung infizierter Zähne verändert. Sie erweiterten Wurzelkanäle von Hunden und teilten die Zähne vier Gruppen zu. Eine Gruppe (=negative Kontrollgruppe) wurde unter aseptischen Bedingungen aufbereitet und abgefüllt. Die drei anderen Gruppen wurden nach Aufbereitung infiziert und koronal verschlossen. Eine davon, die positive Kontrollgruppe, wurde so belassen. In den beiden Testgruppen wurde in infiziertem Zustand eine Wurzelkanalfüllung durchgeführt. In einer der Testgruppen wurde jedoch vor Obturation für eine Woche Ca(OH)_2 in die Wurzelkanäle appliziert. Nach einigen Monaten wurden die Tiere geopfert und Zahnwurzeln und umgebendes Gewebe radiologisch und histologisch ausgewertet. Radiologisch fand sich in der mit Ca(OH)_2 -Einlage versehenen Gruppe eine signifikant bessere Ausheilung als in der Gruppe, deren Zähne ohne vorherige medikamentöse Einlage obturiert worden waren (302). Histologisch waren ähnliche Ergebnisse erkennbar, alle vier Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander. Die Gruppe mit den infizierten, ungefüllten Zähnen (positive Kontrollgruppe) zeigte die stärksten Entzündungszeichen, gefolgt von der Gruppe, deren Zähne ohne vorherige Medikation wurzelkanalgefüllt wurden. Weit weniger entzündliche Veränderungen fanden sich am Apex der Zähne, in denen Ca(OH)_2 appliziert worden war. Die aseptisch gefüllten Zähne wiesen die geringsten Veränderungen auf (80). Trope et al. konnten auch *in vivo* zeigen, dass die Ausheilung apikaler Läsionen 52 Wochen nach Wurzelkanalbehandlung an Zähnen, in die für eine Woche Ca(OH)_2 appliziert worden war, 10% höher lag als an Zähnen, die ohne vorherige Ca(OH)_2 -Einlage abgefüllt waren. Leider wurde von den Autoren speziell für diese Fragestellung nicht ermittelt, ob der Unterschied signifikant war (119). Shuping et al. erhielten nach Aufbereitung und Spülung mit NaOCl in 62% der Fälle keimfreie Kanäle; hiermit konnten signifikant bessere Ergebnisse erzielt werden im Vergleich zu einer

Aufbereitung und Spülung mit Kochsalzlösung. Nach Ca(OH)_2 -Einlage war die Zahl der keimfreien Kanäle, wiederum signifikant, auf 92,5% gestiegen (194).

In jüngerer Zeit werden Ca(OH)_2 -haltige Guttaperchaspitzen angeboten, die an Stelle der pastösen Zubereitung im Wurzelkanal als Zwischeneinlage appliziert werden sollen. Çalt et al. verglichen die Ca^{2+} -Konzentration im Dentin nach Applikation von pastösen Ca(OH)_2 -Präparaten mit derjenigen von Ca(OH)_2 -Guttaperchaspitzen, wobei die Menge an Ca^{2+} als Maß für die Dissoziation von Ca(OH)_2 gesehen wurde (303). Die nicht aushärtenden Ca(OH)_2 -Präparate setzten kontinuierlich Ca^{2+} -Ionen frei, während dies bei den Guttaperchaspitzen nicht beobachtet werden konnte. Economides et al. zeigten, dass Ca(OH)_2 -haltige Guttaperchaspitzen signifikant weniger Hydroxyl-Ionen freisetzen als zwei nichtaushärtende Ca(OH)_2 -Pasten (304). Podbielski et al. untersuchten die antimikrobiellen Eigenschaften verschiedenartig zusammengesetzter Guttaperchaspitzen (305). Außer bei *Peptostreptococcus micros* zeigte die Guttapercha- Ca(OH)_2 -Kombination einen besseren inhibitorischen Effekt als die anderen Guttaperchamischungen. Leider testeten die Autoren kein frisch angemischtes Ca(OH)_2 als Kontrolle. Auch Distler und Petschelt hatten in ihrer Untersuchung zur Freisetzung von Ca(OH)_2 aus Guttaperchaspitzen keine Kontrollgruppe mit einem nicht erhärtenden Ca(OH)_2 -Präparat (306). Die Autoren fanden heraus, dass alles verfügbare Ca(OH)_2 innerhalb weniger Stunden aus den Guttaperchaspitzen freigesetzt wurde, es kam zu einem rapiden pH-Anstieg auf dem Test-Agar. Nach dieser Abgabe konnten selbst durch Zugabe frischen Lösungsmittels nur noch geringe Mengen an Ca(OH)_2 gelöst werden. Die relativ sporadische mikrobiologische Untersuchung im Rahmen dieser Studie konnte keinerlei inhibitorischen Effekt der Ca(OH)_2 -haltigen Guttaperchaspitzen erkennen lassen. Lueders und Raab konnten dagegen gleichermaßen starke antimikrobielle Eigenschaften von Ca(OH)_2 -haltigen Guttaperchaspitzen und frisch angemischtem Ca(OH)_2 gegen *Streptococcus oralis* demonstrieren (307). Schäfer und Behaissi untersuchten die Alkalisierung von Dentin nach Einlage von entweder frisch angemischtem Ca(OH)_2 oder Ca(OH)_2 -haltigen Guttaperchaspitzen. Über einen Zeitraum von sieben Tagen waren die Guttaperchaspitzen nicht in der Lage, das

Wurzeldentin zu alkalisieren, während die frisch angemischte Paste einen hoch signifikanten Anstieg des pH-Wertes im Dentin bewirkte (308). Ebert et al. verwendeten die Ca(OH)_2 -haltigen Guttaperchaspitzen als definitives Wurzelkanalfüllmaterial und verglichen sie mit herkömmlichen Guttaperchaspitzen. Unter Verwendung von AH26 waren die Ca(OH)_2 -haltigen Guttaperchaspitzen signifikant weniger dicht (309). Es muss jedoch hinzugefügt werden, dass hierbei Methylenblau als Indikator eingesetzt wurde; wie bereits beschrieben, scheint die Kombination Methylenblau/ Ca(OH)_2 zu fraglichen Ergebnissen zu führen. Roach et al. untersuchten an extrahierten Zähnen, inwieweit die Applikation von frisch angemischtem Ca(OH)_2 , einem Mischpräparat aus CMCP und Ca(OH)_2 , einem CHX-Präparat oder Ca(OH)_2 -haltigen Guttaperchaspitzen als intermediäre Einlage im Wurzelkanal eine Penetration von *E. faecalis* zu verhindern in der Lage war. Alle pastösen Medikamente zeigten sich signifikant effektiver als die Guttaperchaspitzen (240).

Die meisten der hier zitierten *In-vitro*-Studien lassen den Schluss zu, dass Ca(OH)_2 -haltige Guttaperchaspitzen keinen Ersatz für pastöses Ca(OH)_2 darstellen. Erstaunlicherweise sehen die Ergebnisse der *In-vivo*-Studien anders aus: Sirén et al. konnten unter Nutzung einer gängigen Samplingtechnik für beide Darreichungsformen (Paste und Guttaperchaspitzen) eine ähnliche Desinfektionswirkung demonstrieren (310). Ebert et al. untersuchten in einer *In-vivo*-Studie klinische und radiologische Parameter nach Einlage Ca(OH)_2 -haltiger Guttaperchaspitzen oder von frisch angemischtem Ca(OH)_2 und konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Varianten feststellen (311). Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den *In-vitro*- und den *In-vivo*-Studien mag im unterschiedlichen Feuchtigkeitszustand liegen: Durch Eintreten von Gewebeflüssigkeit über das apikale Foramen, das Dentin und die Dentintubuli ist *in vivo* kontinuierliche Feuchtigkeit im Wurzelkanal gewährleistet. *In vitro* wurde dieser Punkt möglicherweise nicht berücksichtigt, was zu ungenügender Freisetzung von Hydroxyl-Ionen geführt haben könnte.

2.2.3.2 Lokale Antibiotikum-Kortikoid-Kombinationspräparate

Im Falle eines periapikalen Abszesses wird des öfteren ein lokales Antibiotikum zum Desinfizieren des Wurzelkanalsystemes eingesetzt. Barbakow et al. erhoben 1993 Daten über die Materialien und Techniken, die in freien Praxen von Zahnärzten in der Schweiz eingesetzt wurden (312): Zur Desinfektion werden CMCP (22%), Ca(OH)_2 (60%), Asphalin, eine Paste aus Trioxymethylen, Thymol, Kampfer, Zinkoxid und Paraformaldehyd (67%), und in höchstem Maße Ledermix (81%), ein Antibiotikum-Kortikoid-Kombinationspräparat, eingesetzt.

Bereits 1954 und 1956 wurden Versuche unternommen, im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung durch den Einsatz von Kortikoiden Schmerzmanagement zu betreiben (313, 314). Kommerziell erhältliche Pasten sind Ledermix und Fokalmin bzw. Pulpovital. Ledermix enthält Demeclocyclin als Antibiotikum und Triamcinolon als antientzündliches Agens, während Fokalmin Neomycinsulfat und Chloramphenicol als Antibiotika und Prednisolon als Kortikoid-Komponente aufweist (315).

Die Kortikosteroid-Komponente wird appliziert, um eine Schmerzlinderung durch Unterdrückung von Entzündungsreaktion und Freisetzung von Schmerzmediatoren zu erreichen. Hierdurch wird jedoch auch die Abwehrfähigkeit des Gewebes reduziert. Aus diesem Grunde wird zusätzlich eine antimikrobiell wirksame Komponente benötigt, um einer Vermehrung der Bakterien vorzubeugen.

Die meisten Studien bezüglich der Kortikoid-Antibiotikum-Präparate beschäftigen sich mit Fragestellungen, die sich mit der Reaktion der Pulpa auf das jeweilige Medikament auseinandersetzen (316-333). Bezüglich der intrakanalären Applikation als medikamentöse Zwischeneinlage konnte Trope demonstrieren, dass keine Unterschiede in der Flare-up Rate nach Einsatz von Formocresol, Ledermix oder Ca(OH)_2 -Paste auftraten (334). Dies konnte von Marshall und Liesinger bestätigt werden, die bezüglich postoperativer Schmerzen nur einen Unterschied zwischen sensibler (=öfter postoperative Schmerzen) und densensibler (=weniger oft postoperative Schmerzen) Ausgangssituation, nicht aber der Applikation unterschiedlicher Medikamente feststellen konnten (335). Langeland et al.

untersuchten die Korrelation zwischen dem Auftreten von Schmerzen, der Applikation von Kortikoidpräparaten und dem histologischen Bild der betroffenen Zähne (323). Die Autoren konnten keinerlei Korrelationen feststellen. Sie beobachteten sogar Fälle, in denen nach Applikation von Ledermix wieder Schmerzen auftraten. Im Gegensatz dazu schreibt Ehrmann der Applikation von Ledermix eine reduzierte postoperative Schmerzempfindung zu (336). Abbott et al. untersuchten in zwei Studien die Diffusion der Ledermix-Komponenten (337, 338). Die Autoren führten die gute Wirksamkeit des Medikaments auf seine günstigen Diffusionseigenschaften zurück. Götze untersuchte an pulpitischen Zähnen die Eindringtiefe der Tetracyclin-Komponente von Ledermix. Nach vier Tagen Liegedauer konnte er bei einer verbleibenden Dentinschicht von 0,6mm zwischen Kavität und Pulpa nur ein Vordringen des Antibiotikums in Richtung Pulpa um 0,4mm beobachten. Damit hätte die Pulpa keinerlei Kontakt zu dem Medikament gehabt. Der Autor räumt jedoch ein, dass möglicherweise geringe Konzentrationen des Medikamentes durch die angewandte Methodik nicht erfasst wurden. Übertragen auf den Wurzelkanal sind jedoch 400µm eine beträchtliche Eindringtiefe, die dem Medikament gute Diffusionsfähigkeit bestätigen.

Heling und Pecht wiesen *in vitro* eine gute antibakterielle Wirkung von Ledermix gegen *Staphylococcus aureus* nach, die jedoch nicht nach 48 Stunden sondern erst nach 7 Tagen als optimal betrachtet werden konnte (315). Motsch et al. beobachteten dagegen für Ledermix *in vitro* eine geringe antimikrobielle Wirkung (339). Taylor et al. mischten Ledermixpaste mit einem Ca(OH)_2 -Präparat und verglichen die antibakterielle und toxische Wirkung mit derjenigen von Ledermixpaste allein. Die Autoren stellten fest, dass die antimikrobielle Eigenschaft durch Zugabe von Ca(OH)_2 leicht verstärkt wird, ohne den toxischen Effekt auf die Wirtszellen zu erhöhen (328). Bjorvatn et al. konnten anhand Tetracyclin-imprägnierter Schmelz- und Dentinproben einen antimikrobiellen Effekt über 200 Tage (in getrocknetem Zustand) bzw. 35 Tage (bei Wasserlagerung) feststellen (340).

Abbott untersuchte, inwieweit eine systemische Freisetzung von Kortikosteroid nach intradentaler Applikation von Ledermix stattfindet und schloss aus seinen

Berechnungen, dass systemische Nebenwirkungen unwahrscheinlich sind (341).

Insgesamt kann aufgrund der vorliegenden Literatur keine erschöpfende Auskunft über die Verwendung von Antibiotika-Präparaten im Wurzelkanal gegeben werden, hierzu wären klinische Studien über den Erfolg von Wurzelkanalbehandlungen nach entsprechender Medikation nötig.

2.3 Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen

Nach allen Anstrengungen, die unternommen werden, um das Wurzelkanalsystem zu desinfizieren, gilt es, die keimfreie oder stark keimreduzierte Situation zu erhalten und eine Re-Infektion zu verhindern. Aus diesem Grunde wird eine Wurzelkanalfüllung durchgeführt mit dem Ziel der größtmöglichen Dichtigkeit. Über lange Zeit konzentrierte sich die Forschung auf die apikale Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen. Es wurde angenommen, dass eine apikal undichte Füllung Perkolation und damit ein Eindringen von Gewebeflüssigkeit in das Wurzelkanalsystem zuließe und den Erfolg der gesamten Wurzelkanalbehandlung in Frage stelle (342). In der sogenannten „Washington-Studie“ wurde der Schluss gezogen, dass 60% der Misserfolge von Wurzelkanalbehandlungen als Folge schlechter Wurzelkanalfüllungen entstünden (342). Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, werden vom Körper auch ungefüllte Hohlräume oder nekrotische Gewebe toleriert, solange sie nicht infiziert sind (76). Das heißt, dass auch eine „schlechte“ Wurzelkanalfüllung nicht notwendigerweise zu einem Misserfolg führen muss, solange keine Mikroorganismen präsent sind. Es werden in der Literatur durchaus auch Fälle beschrieben, bei denen es ohne oder bei unzureichender Wurzelkanalfüllung zu einer Ausheilung einer apikalen Lyse gekommen war, allerdings unter stark keimreduzierten Bedingungen (78, 343, 344) (Abb. 9).



*Abbildung 9:
Radiologische Darstellung eines unvollständig gefüllten Prämolaren. Es muss davon ausgegangen werden, dass in dem ungefüllten Abschnitt des Wurzelkanals nekrotisches oder zumindest stark degeneriertes Pulpagewebe liegt. Trotz der zu kurzen Wurzelkanalfüllung findet sich ein intakter Parodontalspalt ohne Radioluzenz.*

Die Perkolation an der Wurzelspitze ist nur dann von Relevanz, wenn sich im Wurzelkanalsystem noch Keime befinden. Die Gewebeflüssigkeit dient diesen möglicherweise als Substrat und kann damit die Grundlage zum Überleben und zur Vermehrung bilden. Die eigentliche Funktion einer Wurzelkanalfüllung besteht demnach darin, eine Kommunikation zwischen dem Apex und der Mundhöhle zu verhindern und eventuell verbleibende Restbakterien im Wurzelkanalsystem so „einzuzementieren“, dass sie nicht mehr überlebensfähig sind.

In einem etwa 20-minütigen Stummfilm aus dem Jahre 1917 wird von M.L. Rhein aus New York ein endodontisches Behandlungskonzept vorgestellt, das den heute gängigen Kriterien entspricht (345). Es wird der korrekte achsengerechte Zugang dargestellt, die Desinfektion des Wurzelkanals, die radiologische

Längenbestimmung und die Wurzelkanalfüllung mit Guttapercha. Die gesamte Behandlung findet unter möglichst aseptischen Bedingungen unter Kofferdamapplikation statt. Seitdem sind viele verschiedene Aufbereitungs- und Füllungstechniken entwickelt worden, das Basiskonzept blieb jedoch unverändert. Für die Wurzelkanalfüllung werden heute Pasten oder Zemente einrotiert, mit Guttapercha kombiniert, oder durch Erzeugen eines Vakuums in das Wurzelkanalsystem gesaugt (346, 171, 172).

Es gibt Fülltechniken, bei denen die Guttapercha kalt und in Stiftform zusammen mit einem Sealer in den Kanal eingebracht wird, entweder als Einzelstift (Singlecone- oder Zentralstifttechnik) oder mittels einer lateralen Kondensationstechnik mit mehreren Stiften (laterale Kondensation). Bei anderen Techniken wird die Löslichkeit von Guttapercha in diversen Lösungsmitteln, z.B. in Chloroform genutzt. Die so erweichte Guttapercha wird im Wurzelkanal adaptiert oder kondensiert (Chloropercha-Technik). Weitere Techniken basieren auf der leichten Erwärm- und damit Kondensierbarkeit, sie werden als thermoplastische Wurzelkanalfülltechniken bezeichnet (Vertikale Kondensation, Obtura, Ultrafil, Thermafil, Densfil, Quickfill, System B, Trifecta). Manche dieser Techniken arbeiten mit zwei Guttapercha-Konsistenzen, die sich durch Viskosität und Fließverhalten unterscheiden, die festere Guttapercha übt dabei beim Applizieren im Wurzelkanal einen Stempeldruck auf die fließfähigere Guttapercha aus (Multi-Phase-II).

2.3.1 Farbstoffpenetrationstests

Die Dichtigkeit der verschiedenen Fülltechniken wurde auf vielfältige Weise zumeist an extrahierten Zähnen untersucht. Hierbei war zunächst das gängigste Verfahren die Testung mittels Farbstoff. Zum Einsatz kamen u.a. Methylenblau (0,1% -5%) (347-381), Tinte oder Tusche (382-410), Eosin (411-414), Preussisch Blau (394), Anilinblau (415), Fuchsin (416-421), fluoreszierender Farbstoff (422, 423), Procion Brilliant Blau oder Grün (424-429), Fettrot (430), Silbernitrat (431) oder Poly-R-Farbstoff (432).

Das Problem besteht hierbei darin, an die Füllungs-Zahn-Grenze im Wurzelkanal heranzukommen, um die Eindringtiefe des Farbstoffes zu ermitteln.

Manche Autoren kerbten die Zähne der Länge nach ein und spalteten sie vorher oder anschließend (415, 411, 348, 350, 352, 353, 431, 354, 383, 358, 360-364, 366, 433, 370, 434, 372, 374-379, 407, 381, 409).

Andere Autoren fertigten Querschnitte an und ermittelten so die Penetrationstiefe (435, 436, 349, 412, 351, 430, 437, 355-357, 413, 359, 423, 414, 365, 367, 432, 369, 371).

Oftmals wurden die Zähne jedoch auch nach Wurzelkanalfüllung demineralisiert und z.B. mit Methylsalizylat durchsichtig gemacht. So konnte der eingedringende Farbstoff ermittelt werden, ohne dass die Zahnform zerstört werden musste (438, 382, 424-426, 384, 427, 385, 386, 428, 387-391, 368, 392, 439, 393-396, 373, 429, 397-406, 380, 408, 381). Einige Autoren lösten die gesamten Zähne auf, um anschließend nur noch die Wurzelkanalfüllungen betrachten zu können (440, 441).

Andere Verfahren beruhten auf radiologischer Auswertung (442, 434), dem Einsatz radioaktiver Isotope (443, 435, 444-450, 437, 451), elektrochemischer Verfahren (452-456), dem Einsatz von Säuren (Butter- und Valeriansäure) als Penetrationsindikator (457), einem Flüssigkeits-Transport-Modell (458-460) oder der Verwendung von LPS (461-463) als Indikator für die Undichtigkeit einer Füllung.

Die Expositionszeit mit den jeweiligen Tracern variierte hierbei enorm: Von 3 Minuten (369, 371), 20 min (jedoch in der Zentrifuge) über zwei Stunden (444, 431, 383, 365), vier Stunden (446), fünf Stunden (451), 24 Stunden (349, 448, 382, 423, 360, 385, 403), 48 Stunden (435, 411, 412, 352, 426, 353, 437, 413, 384, 363, 414, 386, 370, 396, 375, 378), drei Tage (415, 350, 360, 388, 392, 400, 401), vier Tage (424, 425, 356, 357, 428, 395, 407), fünf Tage (427, 366, 429, 399, 409), eine Woche (351, 359, 387, 367, 391, 432, 393, 394, 373, 397, 377, 406, 408), neun Tage (374), zehn Tage (355, 360, 405, 380), zwei Wochen (354, 358, 362, 390, 368, 372, 398, 376, 377) bis zu einem Monat (348, 377, 404) wurden die Zähne den jeweiligen Penetrationsindikatoren ausgesetzt.

Abgesehen von einer verschwindend geringen Anzahl von Studien, befassten sich die meisten hier zitierten Arbeiten mit der Dichtigkeit der Wurzelkanalfüllungen am Apex.

Bakterien und bakterielle Toxine stellen *in vivo* für die periapikalen Gewebe ein Gefahrenpotenzial dar. Diese sollten also möglichst durch Wurzelkanalfüllungen an der Passage durch den Wurzelkanal gehindert werden. Ebenso sollen Flüssigkeiten, die Substrat für die Bakterien transportieren können, an einer Penetration gehindert werden. Als Testindikatoren sollten also Substanzen zum Einsatz kommen, die in ihrer Molekülgröße den oben genannten Entzündungsauslösern entsprechen oder sie unterschreiten. Hier bieten sich theoretisch Farbstoffmoleküle an, und die Philosophie der Farbstoffpenetrationsversuche (s.o.) beruht auf der Annahme, dass Farbstoffe ein kritischer Indikator sind, da sie wesentlich kleiner als Mikroorganismen sind und daher ein „Worst-Case-Szenario“ darstellen. Torabinejad et al. verwendeten Bakterien, um zu untersuchen, ob Wurzelkanalfüllungen eine ausreichende Barriere darstellen (464). Die zwei Spezies, die die Autoren einsetzten, penetrierten die gefüllten Wurzelkanäle innerhalb von 10 bis 73 Tagen. In einem ähnlichen Experiment fanden Khayat et al. eine Passage von 4 bis 48 Tagen (465). Im Gegensatz hierzu berichten die meisten Farbstoffpenetrationsstudien über eine Eindringtiefe des Farbstoffes von wenigen Millimetern. Eine vollständige Penetration durch den Wurzelkanal wurde selten beobachtet, unabhängig davon, ob die Zähne für kurze oder lange Zeit dem Farbstoff ausgesetzt waren, ob sie Tusche, Methylenblau oder basischem Fuchsin ausgesetzt waren, ob sie zentrifugiert wurden oder ob ein Vakuum appliziert wurde, um nur einige Beispiele zu nennen (466, 360, 385, 467, 289, 370, 371, 417, 418, 407, 408). Diese Beobachtung widerspricht der Vermutung, dass ein Agens von geringer molekularer Größe ein kritischer Indikator für die Penetrationsfähigkeit von Wurzelkanalfüllungen sei. Faktoren wie elektrische Ladung, pH-Wert, Temperaturwechsel, die Fähigkeit lebender Mikroorganismen, sich in Form und Größe zu verändern und sich aktiv zu bewegen, können offensichtlich nicht durch eine wässrige Farbstofflösung erfasst werden.

Bereits 1989 stellten Goldman und Rush den Sinn der Farbstoffpenetrationstests in Frage, gefolgt von Wu und Wesselink im Jahre 1993 (468, 469). Spångberg et al. und Goldman et al. zeigten, dass eingeschlossene Luftblasen im Wurzelkanal die Eindringtiefe von Farbstoff verfälschen können (468, 470). Es wurde vorgeschlagen, das Problem durch Farbstoffexposition unter

Vakuumapplikation oder Zentrifugation zu überwinden. Dickson und Peters und Karagöz-Küçükay et al. konnten jedoch zeigen, dass die sich Penetrationstiefe des Farbstoffes mit oder ohne Vakuumapplikation oder Zentrifugation nicht unterschied (399, 401). Starkey et al. demonstrierten, dass die Penetrationstiefe des Farbstoffes signifikant mit dem pH-Wert des verwendeten Methylenblaus anstieg (471). Diese methodischen Ungereimtheiten veranlassten einige Autoren dazu, zu untersuchen, ob Korrelationen zwischen Farbstoffpenetrationstests und anderen Methodiken bestünden. Kersten und Moorer untersuchten die Penetration von LPS, Methylenblau und Latexkugeln, die in ihrer Größe einem Streptokokken-Organismus glichen, mit Butter- und Valeriansäure. Die Autoren fanden verstärkte Penetration der niedermolekularen Substanzen (Methylenblau, Butter- und Valeriansäure), ermittelten aber nicht, ob eine statistische Korrelation zwischen den einzelnen Indikatoren bestand (461). Pitt Ford fand keine Korrelation zwischen der Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen, ermittelt durch Farbstoffpenetration, und der Reaktion periapikaler Gewebe, untersucht an Beagle Hunden (472). Die Aussagekraft dieser Studie ist jedoch zu hinterfragen, verglich sie doch *in vitro* gelegte mit *in vivo* gelegten Wurzelkanalfüllungen, lediglich die Wurzelkanalfüllmethode war identisch. In einer eigenen *In-vitro*-Untersuchung fanden wir keinerlei Korrelation zwischen einem Farbstoffpenetrationstest und der Passage von Bakterien durch den Wurzelkanal. In dem von uns durchgeführten Experiment wurden an den gleichen Wurzeln Farbstoff und Bakterien getestet. Wo Bakterien durch und durch penetriert waren, war der Farbstoff z.T. nur unvollständig von koronal nach apikal vorgedrungen und umgekehrt (421). Während sich im Farbstoffpenetrationstest signifikante Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Sealern gefüllten Zähnen, waren keine Unterschiede im Bakterientest erkennbar. Kontakiotis et al. fanden ebenfalls keinerlei Übereinstimmung zwischen einem Farbstoffpenetrationstest und einem Flüssigkeits-Transport-Modell (291). Ebenso prüften Wu et al. vergleichend die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen mit dem Flüssigkeits-Transport-Modell und der Passage von Bakterien. Hierbei zeigte sich das Flüssigkeits-Transport-Modell als wesentlich empfindlicher als die Bakterienpassage, weshalb es von den Autoren favorisiert wurde (473).

2.3.2 Penetrationstests mit Bakterien

Seitdem einige Autoren zeigten, dass Wurzelkanalfüllungen undicht und von koronal penetrierbar sind, konzentriert sich die Forschung mehr und mehr darauf, wie die Kommunikation zwischen Mundhöhle und Apex zu unterbinden ist (384, 474, 475, 464, 465). Es werden nicht mehr nur die Wurzelspitzen betrachtet, sondern die Wurzelkanalfüllungen in ihrer gesamten Länge einschließlich der koronalen Versorgungen. Ray und Trope untersuchten radiologisch den periapikalen Status wurzelkanalgefüllter Zähne und konnten ihn mit dem radiologischen Erscheinungsbild der koronalen Restauration korrelieren (476). Es kristallisiert sich immer stärker heraus, dass nicht ausschließlich die apikale Dichtigkeit von Relevanz für den Erfolg von Wurzelkanalfüllungen ist, sondern ebenso die koronale Dichtigkeit der Barrieren, die eine Infektion oder Re-Infektion des Periapex verhindern soll (Abb. 10 a und b).

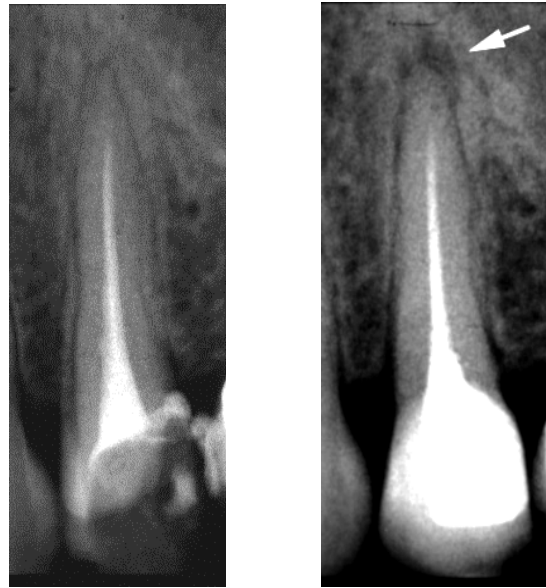


Abb. 10 a

Abb. 10 b

Abbildungen 10 a und b:

Radiologische Darstellung der apikalen Verhältnisse eines Prämolaren nach Wurzelkanalfüllung: Kontrollaufnahme unmittelbar nach Füllung (Abb. 10 a) und sechs Monate später (Abb. 10 b). In der Zeit zwischen dem Entstehen der beiden Röntgenbilder hat sich eine apikale Parodontitis etabliert, erkennbar an der Transluzenz an der Wurzelspitze (Pfeil). Ursache hierfür könnte eine iatrogene Einschleppung von Keimen während der Wurzelkanalbehandlung oder eine insuffiziente Deckfüllung sein.

Immer häufiger werden Bakterien als Indikator für die Penetrierbarkeit von Wurzelkanalfüllungen eingesetzt. Einige Studien untersuchten unterschiedliche Sealer bezüglich ihrer Fähigkeit zu bakteriendichter Adaptation (477, 478, 421, 479). In keiner dieser Studien ergaben sich Unterschiede zwischen den diversen Sealern, außer bei Timpawat et al. (479), bei denen der Sealer Apexit nach 30 Tagen signifikant mehr undichte Proben aufwies als die Sealer AH-Plus oder Ketac-Endo. Khayat et al. untersuchten unterschiedliche Füllungstechniken und fanden ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (laterale Kondensation vs. vertikale Kondensation) (465). Cerutti et al. untersuchten vertikale Kondensation, laterale Kondensation, System B und Thermafil-Technik in ihrer Dichtigkeit gegen Bakterien und fanden signifikante Unterschiede, wobei die laterale Kondensation am besten und die Thermafil-Gruppe am schlechtesten abschnitt (480).

Auch bei den Dichtigkeitstests mit Bakterien stellt sich die Frage nach der Relevanz bzw. nach der Übertragbarkeit auf *In-vivo*-Verhältnisse. Diese Tests laufen in der Mehrzahl so ab, dass ein obturierter, steriler Zahn zwischen zwei Kammern platziert wird. In der oberen wird eine Nährlösung mit Bakterien inokuliert, in der unteren befindet sich eine sterile Nährlösung, die hermetisch verschlossen ist. Ein Zugang zu dieser unteren Kammer ist nur über den Zahn möglich. Es wird abgewartet, ob nach bestimmter Expositionszeit in der unteren Kammer Mikroorganismen nachweisbar sind (s. auch Abb. 20). Wenn eine Wurzelkanalfüllung auch nur einen lebensfähigen Mikroorganismus passieren lässt, kann es in der unteren Kammer zu dessen Vermehrung kommen, wodurch die Probe als Misserfolg gekennzeichnet ist. Wäre hier vitales Gewebe vorhanden, so darf spekuliert werden, es wäre in der Lage, eine geringe Anzahl penetrierter Mikroorganismen zu eliminieren, womit die Wurzelkanalfüllung nicht als Misserfolg zu betrachten wäre. Erstaunlich ist auch, dass sich die Wurzelkanalfüllungen nach relativ kurzer Zeit als undicht erweisen (bis zu 90 Tage). Erst 1997 wurde der erste *In-vivo*-Versuch zu dieser Problematik durchgeführt. Friedman et al. inokulierten die Zugangskavitäten von unterschiedlich wurzelkanalgefüllten Hundezähnen mit autologer Plaque und verschlossen sie anschließend (481). Nach 14 Wochen wurden die Tiere geopfert und die Wurzelspitzen histologisch untersucht. Die Autoren teilten jeweils den Entzündungszustand des Apex einer der Kategorien „keine Entzündung“, „milde Entzündung“ oder „starke Entzündung“ zu. Sie beobachteten in den mit Sealer und Guttapercha gefüllten Zähnen keine (33%) oder milde (67%), jedoch keinerlei starke Entzündungszeichen. Bei Zähnen, die nur mit lateral kondensierter Guttapercha, aber ohne Sealer gefüllt waren, fanden sich in 11% der Fälle starke Entzündungszeichen. In Zähnen, die nur mit Sealer gefüllt waren, traten zu 33%, bei den ungefüllten Kontrollzähnen zu 100% starke Entzündungszeichen am Apex auf. Dieses *In-vivo*-Modell demonstriert zumindest die Wahrscheinlichkeit einer koronal-apikalen Penetration von Mikroorganismen. In einer ähnlichen Studie untersuchten Friedman et al. zwei unterschiedliche Sealer im Hundemodell. Sie beobachteten am Apex der mit dem experimentellen Sealer KT-38 gefüllten Zähne signifikant weniger Entzündungszeichen als am Apex von Zähnen, in denen Roth 801 Sealer appliziert worden war (482). Snider et al. untersuchten tierexperimentell,

ob wurzelkanalgefüllte Zähne ohne Deckfüllung *in vivo* zu einer periapikalen Entzündung führen können. Die Autoren konnten anhand der histologischen Untersuchung zeigen, dass die periapikalen Gewebe bei Wurzelkanalfüllung ohne Deckfüllung oder mit provisorischem Verschluss mit dem Material IRM signifikant stärker entzündet waren als jene mit einer Deckfüllung aus mineralischem Trioxidaggregat (483). Soluti untersuchte, wie lange es dauert, bis die periapikalen Gewebe Zeichen einer Entzündung zeigen, wenn sie nur mit einer Wurzelkanalfüllung versorgt im Munde stehen (484). Der Autor konnte innerhalb der ersten drei Monate Liegedauer keinen Unterschied zwischen den wurzelkanalgefüllten Zähnen mit oder ohne Deckfüllung finden. Nach fünf Monaten jedoch zeigten sich die koronal unversorgten Zähne periapikal als signifikant stärker entzündet. Der Autor empfiehlt daher, wurzelkanalbehandelte Zähne zu revidieren, wenn sie fünf Monate oder länger ohne Deckfüllung im Munde stehen.

Diese Studien legen dar, dass die *In-vitro*-Bakterientests sicherlich ihre Berechtigung haben, dass jedoch möglicherweise die Dauer bis zu einer aus der Undichtigkeit resultierenden apikalen Veränderung relativiert werden muss. Es ist wahrscheinlich, dass die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen *in vivo* nicht anders ist als *in vitro*. *In vivo* wird jedoch möglicherweise die erste Bakterienfront von der Körperabwehr im Rahmen kleiner transienter Entzündungsprozesse aufgefangen, so dass die Auswirkungen in Form massiver Gewebedestruktion erst viel später erkennbar werden.

3 Zielstellung

Die Ergebnisse der Literaturrecherche lassen sich thesenartig und themenbezogen in folgender Weise zusammenfassen:

- 1.) Mechanische Aufbereitung allein ist nicht in der Lage, Mikroorganismen aus dem Wurzelkanalsystem zu eliminieren.
- 2.) Natriumhypochlorit ist ein effektives Desinfektionsmittel, im Vergleich zur rein mechanischen Aufbereitung kann die zusätzliche Anwendung von Natriumhypochlorit zu einer verbesserten Keimelimination beitragen. Eine vollständige Desinfektion kann damit jedoch nicht erreicht werden.
- 3.) Chlorhexidin als Spüllösung ist ebenfalls effektiv, führt jedoch ähnlich wie Natriumhypochlorit nicht zu absoluter Keimfreiheit im Wurzelkanalsystem.
- 4.) Ca(OH)_2 weist als medikamentöse Einlage ein hohes Potenzial zur effektiven Elimination von Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem auf, manche Keime können jedoch trotzdem überleben.
- 5.) Wurzelkanalfüllungen allein können zumindest *in vitro* keinen Schutz vor bakterieller Invasion von koronal bieten.

Es lassen sich daher folgende Fragestellungen formulieren, denen in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden soll:

- 1.) Kann auf die Applikation von Ca(OH)_2 im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung verzichtet werden, indem es vollständig weggelassen oder beispielsweise durch Chlorhexidin als medikamentöse Einlage ersetzt wird?
- 2.) Können neuartige Applikationsformen medikamentöser Einlagen eine ebenbürtige Desinfektion des Wurzelkanalsystems gewährleisten?
- 3.) Können provisorische Füllungsmaterialien eine protektive Funktion gegen eine bakterielle Penetration des Wurzelkanalsystems übernehmen?
- 4.) Hat die Medikation mit verschiedenen intermediären Wurzelkanaleinlagen einen Einfluss auf die Penetrierbarkeit von Wurzelkanalfüllungen?

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, anhand von vier Studien die Notwendigkeit und Art medikamentöser Einlagen zur Reduktion von Mikroorganismen im

Wurzelkanal im Rahmen von Wurzelkanalbehandlungen zu prüfen und ein Konzept zu entwickeln, das das Risiko einer Re-Infektion des Wurzelkanalsystems nach Wurzelkanalfüllung möglichst gering hält.

4 Studie 1:

Die Freisetzung von TNF- α aus LPS exponierten Monozyten nach Vorbehandlung mit Kalziumhydroxid

4.1 Zielstellung

Das Ziel einer Wurzelkanalbehandlung ist die Prävention oder Ausheilung einer apikalen Parodontitis. Da der wichtigste ätiologische Faktor für periapikale Parodontitiden die Präsenz von Mikroorganismen ist (17, 75), konzentriert sich der klinische Behandlungsablauf auf die Desinfektion des Wurzelkanalsystems durch chemomechanische Reinigung. Hierzu wird häufig Kalziumhydroxid (Ca(OH)_2) als medikamentöse Zwischeneinlage verwendet. Obwohl seine antimikrobielle Wirkung mehrfach untersucht und bewiesen werden konnte, ist der genaue Mechanismus, über den diese Wirkung erzielt wird, nicht exakt geklärt. Es ist denkbar, dass Ca(OH)_2 nicht nur durch seine antimikrobiellen Eigenschaften eine Ausheilung der periapikalen Gewebe begünstigt, sondern auch durch seinen Einfluss auf Lipopolysaccharide (LPS). Es ist bekannt, dass sich im infizierten Wurzelkanalsystem große Zahlen gramnegativer anaerober Spezies finden (125), die in ihrer äußeren Zellwand Endotoxin enthalten (485). Diese Endotoxine oder LPS werden während der Zellteilung und nach dem Zelltod freigesetzt (191). Nach der Freisetzung, können die LPS bioaktive entzündliche Mediatoren stimulieren, wie z.B. Produkte des Cyclooxygenase-Stoffwechsels, Lipooxygenase-Produkte, Thrombozyten-aktivierende Faktoren, Interleukine und den Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) (486-490). Dahlén platzierte LPS in die Pulpakammern von Ratten und konnte nach drei Wochen einen signifikanten Anstieg des Antikörper-Titers im Serum dieser Tiere nachweisen (491). In einem weiteren Experiment führten Dahlén et al. bakterielle LPS in die Wurzelkanäle von Affen ein (190). Nach drei bzw. sieben Monaten wurden die Tiere geopfert und die periapikale Region wurde radiologisch und histologisch untersucht. Die Autoren fanden Knochenverlust sowie resorptive und entzündliche Veränderungen am Apex aller experimentellen Zähne. Ebenso wurde eine signifikante Korrelation zwischen der intrakanalären Endotoxin-Menge, spezieller klinischer Symptomatik der Pulpa und der periapikalen Gewebe demonstriert (492, 493). Andere Autoren konnten zeigen, dass LPS für die

Initiierung und Aufrechterhaltung periapikaler Prozesse verantwortlich sind (494-497).

Gegenwärtig konzentriert sich der therapeutische Ansatz einer Wurzelkanalbehandlung auf die chemomechanische Elimination von Bakterien aus dem Wurzelkanalsystem. Trotz Abtötung von Bakterien kann mutmaßlich aufgrund der Präsenz von LPS eine apikale Parodontitis fortbestehen. Obwohl $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ein gut untersuchtes intrakanaläres Medikament ist, wurden über seine Fähigkeit, LPS zu neutralisieren noch nicht viele Studien publiziert. Da eine Methode der Neutralisierung von LPS deren Exposition mit alkalischen Substanzen ist (meistens NaOH) (498), ist es denkbar, dass das stark alkalische $\text{Ca}(\text{OH})_2$ einen ähnlichen Effekt aufweist. Das Ziel dieser Studie war es daher, zu untersuchen, ob $\text{Ca}(\text{OH})_2$ die Fähigkeit besitzt, die biologische Aktivität von *Escherichia coli* LPS zu neutralisieren.

4.2 Material und Methode

Das lyophilisierte Pulver von *Escherichia coli* LPS (Serotyp 055:B5 lot 64H41; Sigma Chemical, St. Louis MO, USA) wurde in pyrogenfreiem Wasser in verschiedenen Konzentrationen aufgelöst (Abb. 11). Sie betrugen 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml oder 1000ng/ml und wurden je zweimal angesetzt. Jeweils 1ml der Lösungen wurden 25mg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Pulver (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) zugegeben, wodurch eine gesättigte Lösung entstand. Zwei Proben ohne Endotoxin dienten als Kontrollen, davon eine nur mit Wasser, die andere mit Wasser und $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Alle Proben wurden für 20 Sekunden auf einem Vortex-Gerät gemischt, anschließend für eine Woche bei 37°C unter konstanter Bewegung inkubiert. Nach Inkubation wurden die Proben für fünf Minuten zentrifugiert, wodurch das unlösliche $\text{Ca}(\text{OH})_2$ von der Flüssigkeit getrennt wurde. Das pelletierte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wurde verworfen, der Überstand für das weitere Experiment verwendet.

Die Blutmonozyten wurden nach der Methode von Thorsby und Bratlie isoliert (499). Für ihre Gewinnung wurden 20ml peripheres Blut von einem gesunden männlichen Spender entnommen, es wurde ohne Zusätze für 40 Minuten bei 25°C gelagert, anschließend für weitere 30 Minuten auf Eis platziert. Der entstandene

Blutkuchen wurde durch Zentrifugieren pelletiert, das Serum wurde abgenommen, durch einen 0,2µ-Filter gefiltert und bei 4°C aufbewahrt.

120ml Blut desselben Spenders wurden in vier 30ml Spritzen aufgezogen, in denen sich je 3,5ml Natriumcitrat befand (0,038mg/ml). In vier 50ml Röhrchen wurden je 300µg 0,5 molaren EDTAs zu 10ml Plasmagel gegeben (Cellular Products, Buffalo, NY, USA), zu jedem wurden 30ml Blut addiert. Die Flüssigkeiten wurden leicht gemischt und für 40 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde das Plasma gesammelt und je 9ml wurden vorsichtig auf 3ml Lymphoprep geschichtet (Nycomed Pharma, AS, Oslo, Norwegen). Die Flüssigkeiten wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Das Monozyten-Band wurde aus jedem Röhrchen entnommen und die gewonnenen Flüssigkeiten wurden dreimal in HBBS mit 10ml 0,1 molarem EGTA und 500ml Gentamycin/500ml gewaschen. Nach dem letzten Durchgang wurde das Zellpellet vorsichtig durch leichtes Klopfen von der Gefäßwand gelöst und in 5ml Zellkultur-Medium 199 mit 0,1% autologem Serum resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ml Medium für 1 Stunde bei 37°C mit 5% CO₂-Begasung inkubiert, um eine Zelladhäsion zu erlauben. Die nichtadhärenten Zellen wurden anschließend mit serum-freien Medium abgewaschen.

Die gewonnenen Zellen wurden für vier Tage in M199 Medium mit 10% autologem Serum in einem Inkubator unter 37°C und CO₂-Begasung kultiviert. Am fünften Tag wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen. Zu 2ml Medium wurden je 1µl der vorab fertiggestellten Endotoxin-Lösungen gegeben und in doppelter Ausführung in die Wells mit den Monozyten pipettiert. Die Zellen wurden mit den zugegebenen Lösungen für weitere vier Stunden inkubiert. Danach wurden die Überstände gesammelt und codiert. Die TNF-α-Konzentrationen wurden mittels eines kommerziell erhältlichen Testkits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in der Abteilung für Immunologie des Center for Gastrointestinal Biology and Disease at the University of North Carolina Hospitals, Chapel Hill, NC, USA bestimmt. Das gesamte Experiment wurde nach einem Vorversuch zweifach durchgeführt.

Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA mit dem Programm StatView 4.02 (Abacus Concepts, Berkely, CA, USA) auf Apple Macintosh durchgeführt.

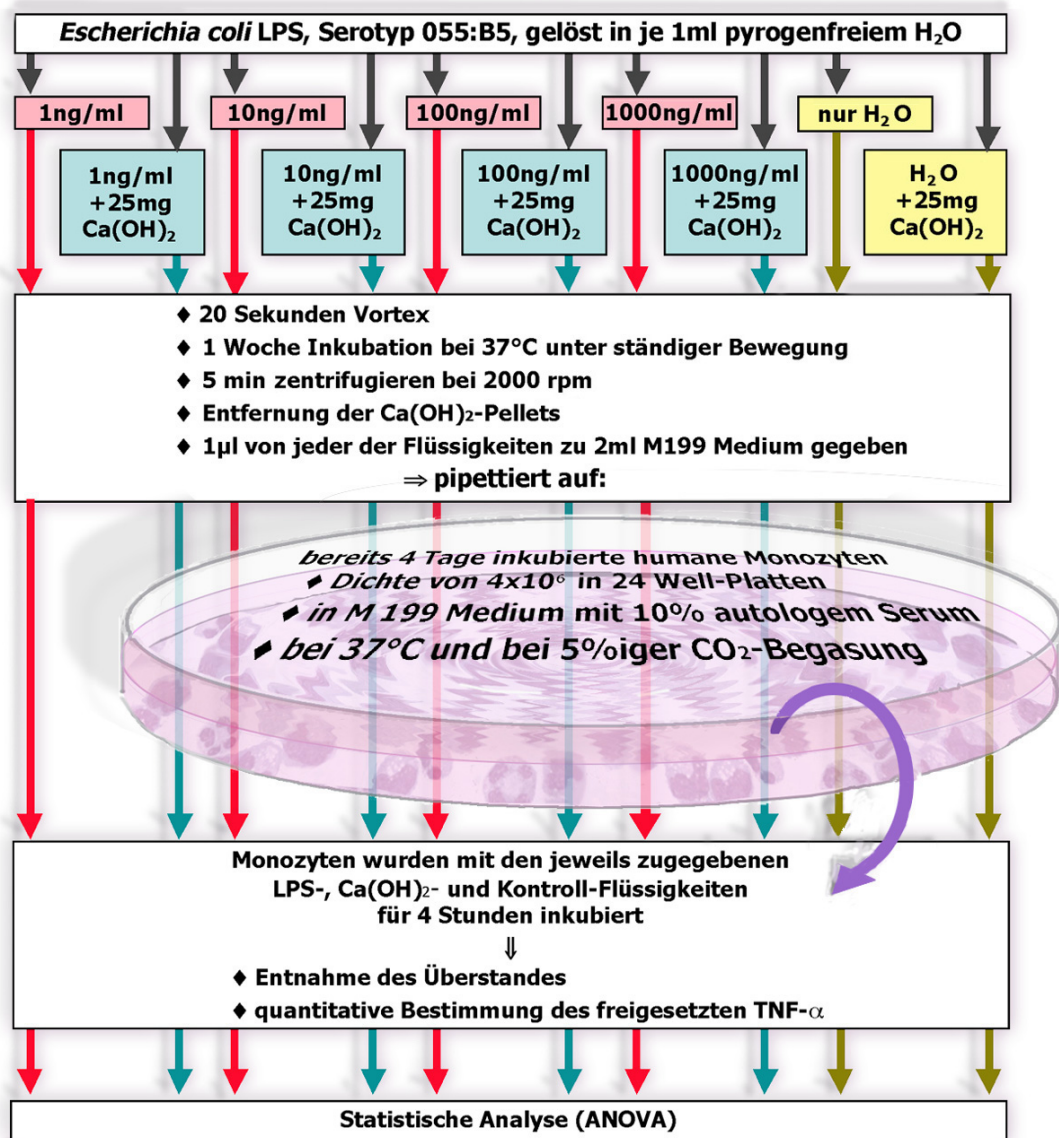


Abbildung 11:
Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Studie 1

4.3 Ergebnisse

Die Kontrollgruppen, bei denen keine LPS zugegeben worden waren, zeigten TNF- α -Konzentrationen zwischen 1 und 12pg/ml (Abb. 12). Bei Exposition mit den verschiedenen LPS-Lösungen ohne vorherige Ca(OH)₂-Behandlung stellten sich TNF- α -Konzentrationen zwischen 500 und 1800pg/ml ein. Waren die LPS mit Ca(OH)₂

vorbehandelt worden, so fanden sich die TNF- α -Konzentrationen zwischen 1–19 pg/ml. Zwischen den Kontrollgruppen und den mit Ca(OH)₂ vorbehandelten Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied, beide Gruppen unterschieden sich jedoch hochsignifikant von der Ca(OH)₂-freien LPS-Gruppe ($p < 0,001$).

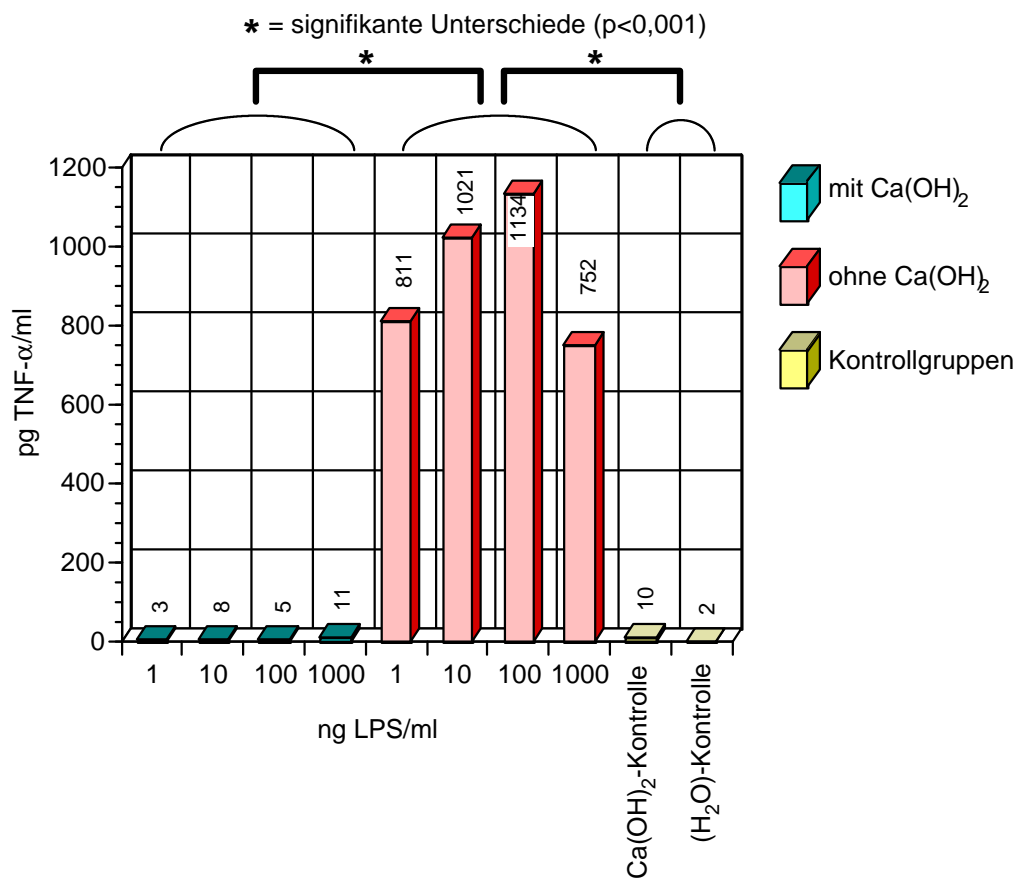


Abbildung 12:

Median der TNF- α -Konzentrationen pro Gruppe nach Exposition der Monozyten mit *E. coli* LPS, die entweder mit Ca(OH)₂ vorbehandelt oder unbehandelt waren

4.4 Diskussion

Bakterielle Endotoxine initiieren die Freisetzung verschiedener entzündungsprovozierender Mediatoren in Monozyten, u.a. auch das lösliche Zytokin TNF- α . Daher wird die TNF- α -Konzentration nach Stimulation menschlicher Monozyten durch LPS als Indikator für die Monozyten-Aktivität verwendet (500, 501).

In dieser Studie wurden LPS-Konzentrationen zwischen 1 und 1000ng/ml eingesetzt, da ähnliche Konzentrationen bei nekrotischem Endodont mit assoziierter periapikaler Parodontitis gefunden wurden (492, 493). Ebenso wurden diese LPS für eine Woche mit Ca(OH)_2 vorbehandelt, da dieser Zeitraum als klinisch relevant und für die Wurzelkanalbehandlung als ausreichend befunden wurde (285). Zwischen den mit Ca(OH)_2 -vorbehandelten LPS und den LPS-freien Kontrollgruppen fand sich kein signifikanter Unterschied der resultierenden $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentration. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht vorbehandelten LPS-Gruppen hochsignifikant höhere $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentrationen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ca(OH)_2 in der Lage ist, LPS hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität zu detoxifizieren.

In der vorliegenden Studie wurden LPS von *Escherichia coli* verwendet. Es gibt viele gramnegative Spezies mit jeweils individuellen LPS. Möglicherweise reagieren die LPS anderer Bakterienspezies anders auf Ca(OH)_2 als die von *E. coli*. Safavi und Nichols führten jedoch ein ähnliches Experiment durch, bei dem sie LPS von *Salmonella typhimurium* oder *Prevotella intermedia* verwendeten (502). Als biologisch aktiven Indikator setzen die Autoren ebenfalls Monozyten ein, jedoch bestimmten sie nicht die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ sondern von PGE_2 , einem Zytokin, das bei der Resorption von Knochen eine wichtige Rolle spielt (503). Olsen et al. untersuchten, inwiefern Ca(OH)_2 LPS von *Pseudomonas aeruginosa* zu deaktivieren vermag, arbeiteten jedoch mit IL-1 β als Marker (504). In beiden Studien waren die Resultate denjenigen der vorliegenden Studie vergleichbar. Der Einsatz verschiedener LPS in den diversen Studien mit ähnlichen Ergebnissen legt die Vermutung nahe, dass Ca(OH)_2 nicht nur die LPS einer Spezies neutralisiert.

Es wurde festgestellt, dass die Lipid-A-Komponente der LPS der Hauptauslöser für die entzündlichen Abläufe ist (505). Aus dieser Studie ist nicht zu ersehen, ob die Inaktivierung der LPS durch Ca(OH)_2 reversibel ist, d.h., ob die LPS nach Entfernung des Ca(OH)_2 wieder ihren entzündungsauslösenden Effekt erhalten. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Deaktivierung irreversibel ist, da im kommerziellen Bereich eine Endotoxin-Deaktivierung verschiedenster LPS durch Alkali-Behandlung mit NaOH durchgeführt wird, welches die pathogene Lipid-A-Komponente der LPS hydrolysiert und gleichzeitig Fettsäuren freisetzt, die ebenfalls

Bestandteile der LPS sind (498). Dies ist auch der Mechanismus, durch den das Ca(OH)_2 die LPS inaktiviert, wie durch Safavi und Nichols gezeigt werden konnte (506). Mit Ca(OH)_2 vorbehandelte LPS zeigen bereits nach einer Stunde eine inhibitorische Wirkung auf die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivität (507). $\text{NF}\kappa\text{B}$ ist ein Faktor, der bei der Transkription bei einigen im Entzündungsgeschehen involvierten Genen regulierend tätig ist. Die Autoren schließen aus ihrer Studie, dass die Fähigkeit von Ca(OH)_2 , die LPS-Stimulation einiger Entzündungsmediatoren zu inhibieren, auf der Ebene der Transkription stattfindet und dass Ca(OH)_2 neben seinen antibakteriellen Eigenschaften auch Eigenschaften besitzt, die entzündungsfördernde Vorgänge inhibieren.

Da LPS an mineralisierte Komponenten des Knochens binden können (508, 509) ist es denkbar, dass LPS ebenfalls an Ca(OH)_2 bindet. Obwohl der basische pH-Wert des Ca(OH)_2 aller Wahrscheinlichkeit nach die Hauptursache für die Deaktivierung der biologischen LPS-Aktivität ist, ist es denkbar, dass LPS über den Weg der Bindung durch die physische Präsenz und anschließende Ausräumung des Ca(OH)_2 aus dem Wurzelkanalsystem beseitigt werden. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht untersucht werden, da das Ca(OH)_2 -Pellet verworfen und nur die gesättigte Lösung verwendet wurde.

Nach Untersuchung des Effektes von Ca(OH)_2 auf Zellwandbestandteile gramnegativer Mikroorganismen stellt sich die Frage, ob auch die Zellwandbestandteile grampositiver Mikroorganismen, Lipoteichonsäuren (LTA), durch das Medikament neutralisiert werden können. Die biologische Aktivität von LTA, die zu einem Entzündungsgeschehen führen kann, wurde von Monefeldt gezeigt (510).

4.5 Schlussfolgerungen

Die $\text{TNF-}\alpha$ -Freisetzung von LPS-exponierten humaner Monozyten nach Vorbehandlung der LPS mit Ca(OH)_2 resultierte in ähnlich niedrigen Konzentrationen wie in den Kontrollgruppen, die keine LPS enthielten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ca(OH)_2 in der Lage ist, LPS - zumindest in den in dieser Studie

verwendeten Konzentrationen - zu neutralisieren und damit einen Beitrag zur Vermeidung oder der Ausheilung periapikaler Entzündungen zu leisten.

5 Studie 2:

Antimikrobielle Eigenschaften von Chlorhexidin und Kalziumhydroxid in unterschiedlichen Darreichungsformen. Ein *In-situ*-Modell

5.1 Zielstellung

Mikroorganismen sind die Hauptursache für pathologisches Geschehen am Apex. Aus diesem Grunde ist die Wurzelkanalbehandlung auf die Elimination von Mikroorganismen ausgerichtet. Die rein mechanische Reinigung und Aufbereitung kann keine sichere Keimfreiheit in Wurzelkanälen erzielen (115). NaOCl als Zusatz zur mechanischen Aufbereitung kann in etwa 60% der Fälle zu bakterienfreien Wurzelkanälen führen (285, 174). Die besten Ergebnisse können erzielt werden, wenn eine medikamentöse Zwischeneinlage in Kombination mit chemomechanischer Aufbereitung appliziert wird (285, 174).

Die antimikrobiellen Eigenschaften von Kalziumhydroxid konnten ebenso nachgewiesen werden wie seine Wirkung gegen Endotoxine (285, 502). Um die Applizierbarkeit des Medikamentes zu vereinfachen, wurden kürzlich kalziumhydroxidhaltige Guttaperchaspitzen entwickelt. Trotz der gut untersuchten antimikrobiellen Eigenschaften existieren Studien, die von Spezies berichten, die mit therapieresistenten Fällen assoziiert sind und resistent gegen Kalziumhydroxid zu sein scheinen, wie z.B. *Enterococcus faecalis* oder *Candida* Spezies (146, 230, 102). Die Forschung konzentriert sich daher in jüngerer Zeit auf alternative Medikamente. Chlorhexidin vermag an Zahnhartsubstanzen zu adhäreren und zeigt eine gewisse Substantivität (216, 237). Es ist in der Lage, gramnegative und grampositive Bakterien-Spezies zu eliminieren (511). Bisher wurde Chlorhexidin in der Endodontie vor allen Dingen in Form einer Spüllösung als Zusatz zur mechanischen Aufbereitung verwendet. Da es gute antimikrobielle Eigenschaften besitzt, könnte es von Interesse sein, Chlorhexidin als medikamentöse Zwischeneinlage zu verwenden. Zu diesem Zweck muss ein adäquates Applikationssystem entwickelt werden. Kürzlich wurden - wie für Kalziumhydroxid - medikamentöse Guttaperchaspitzen entwickelt, die Chlorhexidin enthalten und ein leichtes Einbringen in den Kanal erlauben.

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwieweit frisch angemischte Kalziumhydroxidpaste, kalziumhydroxidhaltige Guttaperchastifte, ein experimentelles Chlorhexidin-Gel oder chlorhexidinhaltige Guttaperchastifte in der Lage sind, Bakterien im Wurzelkanal ohne zusätzliche chemomechanische Reinigung zu eliminieren. Als Testmethode sollte ein neues *In-situ*-Modell zur Anwendung kommen.

5.2 Material und Methode

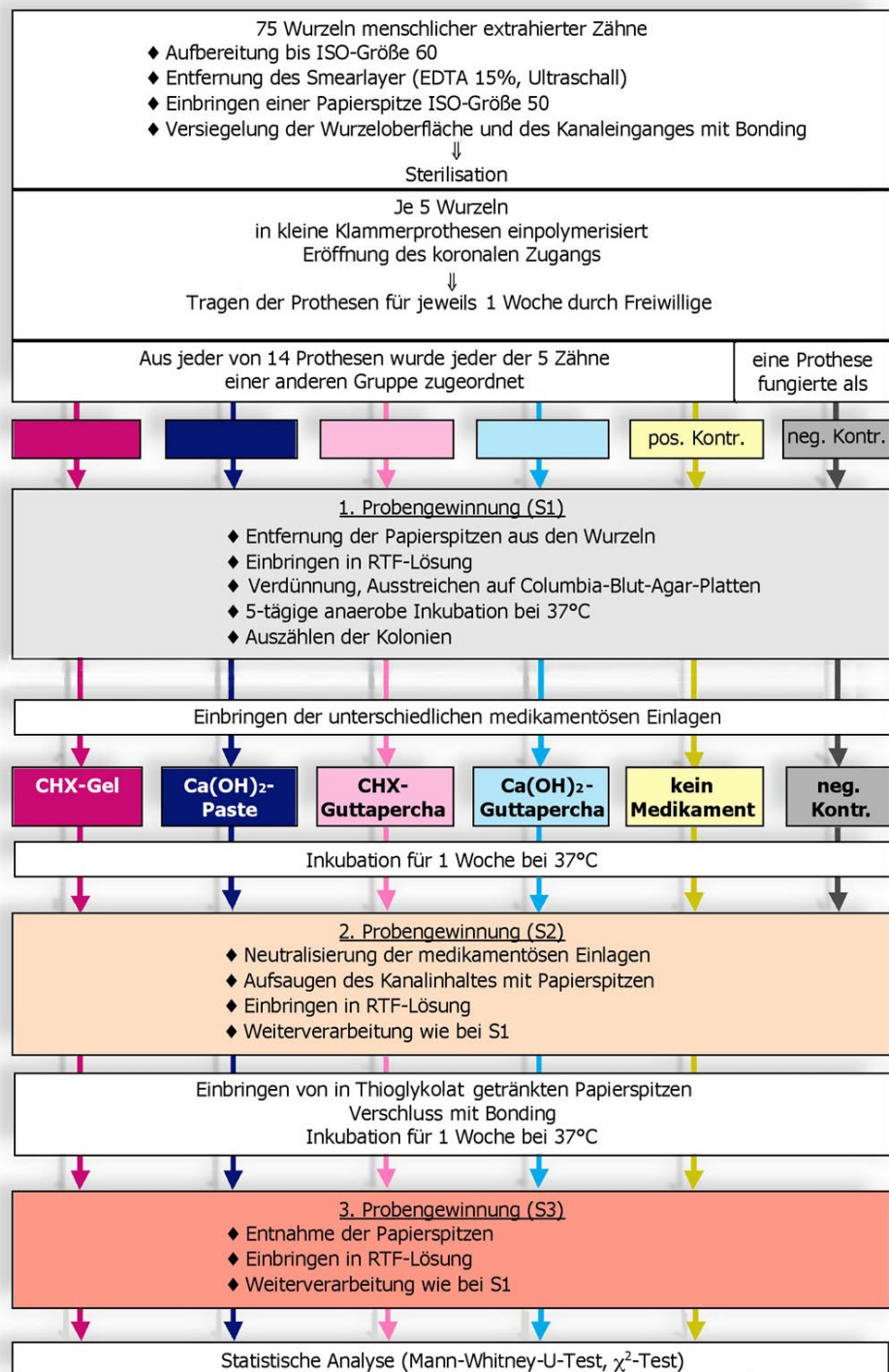
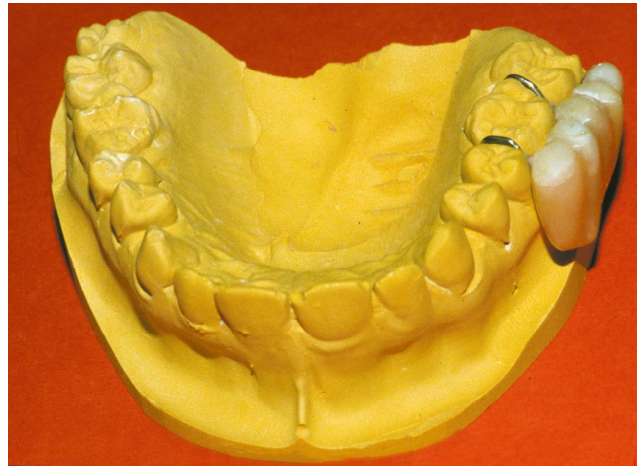


Abbildung 13:
Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Studie 2

5.2.1 Vorbereitung der Zähne

Die Kronen von 75 einwurzligen, extrahierten menschlichen Zähnen, die für unterschiedliche Zeitintervalle in 20%igem Alkohol gelagert waren, wurden an der Schmelz-Zement-Grenze abgetrennt und verworfen (Abb. 13). Die Wurzeloberflächen wurden sorgfältig von Resten des parodontalen Ligamentes befreit. Die Wurzelkanäle wurden bis zu einer Masterfeile der ISO-Größe 60 bis 1mm vor den Apex aufbereitet. Um den Smearlayer von den Kanalwänden zu entfernen, wurden die Wurzeln für 20 Sekunden mit Ultraschall und 15%iger EDTA-Lösung behandelt. Die gesamten Wurzeloberflächen wurden anschließend geätzt, konditioniert und mit einem dünnfließenden, schwach gefüllten Komposit (Optibond FL, Kerr, Karlsruhe, D) unter Aussparung des koronalen Zuganges versiegelt. In jeden Kanal wurde eine Papierspitze der ISO-Größe 50 eingebracht. Anschließend wurde der Kanaleingang vorsichtig mit Bonding verschlossen. Nach Sterilisation der Zähne wurden sie mit einer dünnen Wachsschicht überzogen, die als Isolation gegen das nachfolgend applizierte PMMA-Polymer fungierte.

Von zwei Freiwilligen wurden Abformungen des Oberkiefers genommen, aus denen Gipsmodelle hergestellt wurden. Auf diesen Modellen wurden im Seitenzahnbereich im Vestibulum kleine Prothesen angefertigt, die durch zwei Überwurflammern zum Halten gebracht wurden. Die Prothesen wurden so installiert, dass sie unterhalb der Kauebene lagen und somit den Kauvorgang nicht stören konnten. In die Prothesenkörper wurden je fünf der vorbereiteten Wurzeln einpolymerisiert, wobei der koronale Teil der Wurzeln zur Mundhöhle offen blieb (Abb. 14 a und b).

*Abb. 14 a**Abb. 14 b*

Abbildungen 14 a und b:

Prothese mit einpolymerisierten Wurzeln auf dem Modell (Abb. 14 a) und im Munde (Abb. 14 b)

5.2.2 Probengewinnung

Insgesamt wurden 15 solcher Prothesen angefertigt. Jede wurde für eine Woche im Munde eines der Freiwilligen getragen. Bevor sie eingesetzt wurden, wurde der mit Bonding versehene Zugang zum Wurzelkanal geöffnet. Die Prothesen wurden Tag und Nacht getragen und nur während der Routine-Mundhygienemaßnahmen entfernt und in handwarmes Wasser gelegt.

Nach einer Woche wurde aus jeder Wurzel die Papierspitze entfernt und zügig in ein eigenes Behältnis mit 1ml Reduced Transfer Medium (RTF, hergestellt in der

Apotheke der Charité, Humboldt Universität zu Berlin, D) eingebracht. Anschließend wurden in jeden Kanal drei in RTF getauchte Papierspitzen für je 10 Sekunden eingebracht, um eventuell verbliebene Restbakterien zu sammeln. Diese drei Papierspitzen wurden jeweils zusammen mit der zuerst entnommenen Papierspitze aufbewahrt. Die so gewonnen Proben wurden als "S1" (=erste Probe) bezeichnet und innerhalb von vier Stunden weiter verarbeitet. Nach Herstellung von bis zu sieben Zehnfach-Verdünnungen wurden je 100µl der verdünnten Flüssigkeiten auf Columbia-Blut-Agar-Platten (hergestellt in der Nährboden-Küche der Charité, Humboldt Universität Berlin) ausgestrichen und unter Zugabe von Anaerogen (Oxoid, Basingstoke, GB) für fünf Tage bei 37°C im Anaerobentopf bebrütet. Nach Bebrütung der Agars wurden die Kolonien blind ausgezählt.

Nach Gewinnung der S1-Proben wurden die Wurzeln mit unterschiedlichen Medikamenten gefüllt, mit lichthärtendem Bonding verschlossen und in 1ml physiologischer Kochsalzlösung bei 37°C unter Sauerstoffausschluss für eine weitere Woche inkubiert.

Die Zähne wurden in sechs Gruppen geteilt: Die erste (= "CHX-Gel") wurde mit einem experimentellen 5%igen Chlorhexidin-Gel gefüllt, die zweite Gruppe (= "CH-Paste") mit frisch angemischter Kalziumhydroxid-Paste. In der dritten Gruppe (= "CHX-GP") wurden chlorhexidinhaltige Guttaperchaspitzen mit 5% CHX-Anteil (activ point, Roeko, Langenau, D) zusammen mit einem Tropfen steriler Kochsalzlösung eingebracht. Die vierte Gruppe (= "CH-GP") erhielt je eine kalziumhydroxidhaltige Guttaperchaspitze mit etwa 52% Ca(OH)_2 -Anteil (Calciumhydroxid Plus; Roeko, Langenau, D) zusammen mit einem Tropfen steriler Kochsalzlösung. Die fünfte Gruppe diente als positive Kontrollgruppe (= "Kontrolle"), in diese Wurzeln wurde je eine Papierspitze eingebracht, die in Thioglykolat (hergestellt in der Nährboden-Küche der Charité, Humboldt Universität Berlin) getränkt war. Alle eingesetzten Flüssigkeiten und Agars wurden vor Verwendung mit Anaerogen vorreduziert. Nach Einbringen der Medikamente wurden die Wurzeln wieder mit lichthärtendem Bonding verschlossen und in physiologischer Kochsalzlösung unter sauerstoffarmen Bedingungen bei 37°C gelagert.

Danach wurden die Zähne wieder eröffnet, und die Medikamente wurden

neutralisiert. Für die Wurzeln, in denen sich Chlorhexidin befand, wurde eine spezielle Lösung verwendet, die die antimikrobiellen Eigenschaften des Chlorhexidins neutralisiert, ohne bakterielles Wachstum zu beeinflussen (512). Die Zähne, die Kalziumhydroxid enthielten, wurden mit 0,5%iger Zitronensäure neutralisiert (112). Danach wurden aus den einzelnen Zähnen wiederum durch Einbringen je dreier RTF-getränkter Papierspitzen für insgesamt 30 Sekunden Proben gewonnen, die in je 1ml RTF-Medium gesammelt wurden (=S2). Nach diesem Vorgang wurde in jeden Kanal eine in Thioglykolat getränkte Papierspitze eingebracht, die Zähne verschlossen und wie bereits beschrieben für eine weitere Woche aufbewahrt. Nach dieser Woche wurden alle Papierspitzen entfernt und in separate RTF-Behälter eingebracht. Wiederum wurden mit je drei RTF-getränkten Papierspitzen in jedem Kanal für insgesamt 30 Sekunden eventuell verbliebene bzw. nachgewachsene Mikroorganismen gesammelt und in die entsprechende Behälter eingebracht (=S3). Alle gewonnenen Proben wurden auf Wachstum anaerober Mikroorganismen untersucht und die CFU wurden ausgezählt. Eine Prothese (negative Kontrolle) mit fünf Wurzeln wurde nach Einlage steriler, in Thioglykolat getränkter Papierspitzen in verschlossenem Zustand für eine Woche getragen. Danach wurden die Papierspitzen entnommen und neue Papierspitzen eingebracht. Die Wurzeln wurden anschließend für eine weitere Woche bebrütet und die Papierspitzen danach entnommen. Nach Einbringen aller Papierspitzen in separate RTF-Behälter wurde durch anaerobe Bebrütung auf Columbia-Agar-Platten überprüft, ob bakterielles Wachstum auftrat. Hiermit sollte verifiziert werden, ob unter sterilen Bedingungen gearbeitet worden war und ob das System ausschließlich die gewollte bakterielle Besiedlung garantierte.

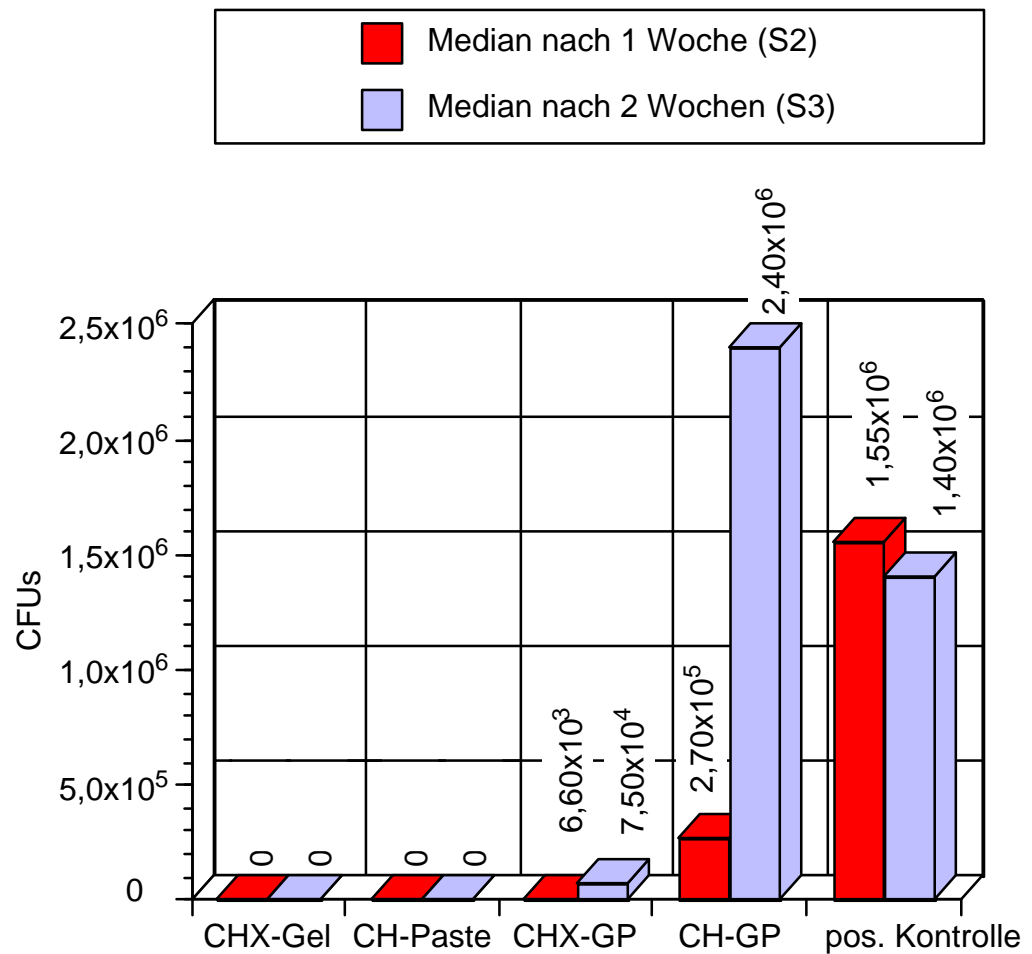
Eine statistische Analyse wurde mit StatView 5.0 (Abacus, CA, USA) unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Testes, des Mann-Whitney-U-Testes und des χ^2 -Testes auf Apple Macintosh durchgeführt.

5.3 Ergebnisse

In der negativen Kontrollgruppe konnte zu keinem Zeitpunkt bakterielles Wachstum nachgewiesen werden. Zwischen den S1-Proben der Test- und positiven

Kontrollgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Bakterienzahl festgestellt werden. Für S2 und S3 kann der Median der Bakterienzahl pro Gruppe aus Abbildung 15 gesehen werden. Nach einwöchiger Applikation der medikamentösen Einlagen (=S2) zeigten alle Testgruppen signifikant weniger Bakterien als die positive Kontrollgruppe. Die mit CHX-Gel und Ca(OH)_2 -Paste behandelten Wurzeln waren den beiden Gruppen signifikant überlegen, in denen in die Wurzeln Ca(OH)_2 - bzw. CHX-Guttapercha eingelegt worden waren. Nachdem die Wurzeln für eine weitere Woche ohne Medikamente inkubiert worden waren (=S3), konnte in einigen Proben erneut Bakterienwachstum festgestellt werden. Nach dieser Woche fanden sich in den mit CHX-Gel oder Ca(OH)_2 -Paste behandelten Zähnen signifikant weniger Bakterien als in den Zähnen aller anderen Gruppen. Die Gruppen „CH-GP“ und „CHX-GP“ unterschieden sich diesmal nicht signifikant von der positiven Kontrollgruppe.

Bei der Frage, in welchem Kanal nach medikamentöser Einlage gar keine Mikroorganismen mehr vorhanden waren, zeigten sich in der Gruppe „CHX-Gel“ 10 Proben ohne nachweisbare Bakterien (71%). In der Gruppe „CH-Paste“ traf dies für 12 Proben zu (86%), während in der Gruppe „CHX-GP“ nur drei Proben (21%) ohne nachweisbare Bakterien waren. In der Gruppe „CH-GP“ und in der positiven Kontrollgruppe fanden sich in allen Wurzeln Mikroorganismen. Nach der Woche ohne medikamentöse Einlage (S3) konnte in einigen keimfreien Wurzelkanälen erneut Bakterienwachstum festgestellt werden. Dies resultierte in je neun keimfreien Kanälen in den Gruppen „CHX-Gel“ und der „CH-Paste“ (je 64%), und drei in der Gruppe „CHX-GP“ (21%). In beiden Wochen (S2 und S3) waren die Gruppen „CHX-Gel“ und „CH-Paste“ allen anderen Gruppen signifikant überlegen und zwischen den Gruppen mit Guttapercha-Applikation und der positiven Kontrollgruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16 und 17).



Alle Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$) außer:

S2-Proben: ns = CHX-Gel vs. CH-Paste

ns = CHX-GP vs. CH-GP

S3-Proben: ns = CHX-Gel vs. CH-Paste

ns = CHX-GP vs. CH-Paste

ns = CHX-GP vs. pos. Kontrollgruppe

ns = CH-GP vs. pos. Kontrollgruppe

ns= nicht signifikant

Abbildung 15:

Grafische Darstellung des Medians der Anzahl CFU pro Gruppe nach einer bzw. zwei Wochen

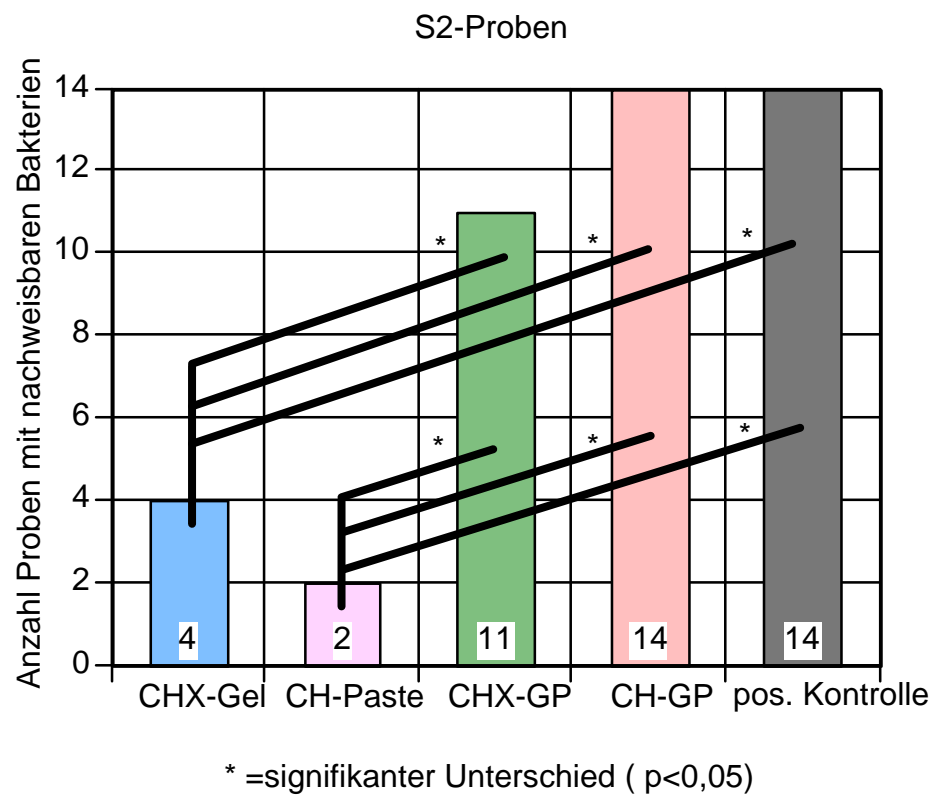


Abbildung 16:

Grafische Darstellung der Anzahl an Proben, die nach einer Woche positive Kulturen aufwiesen

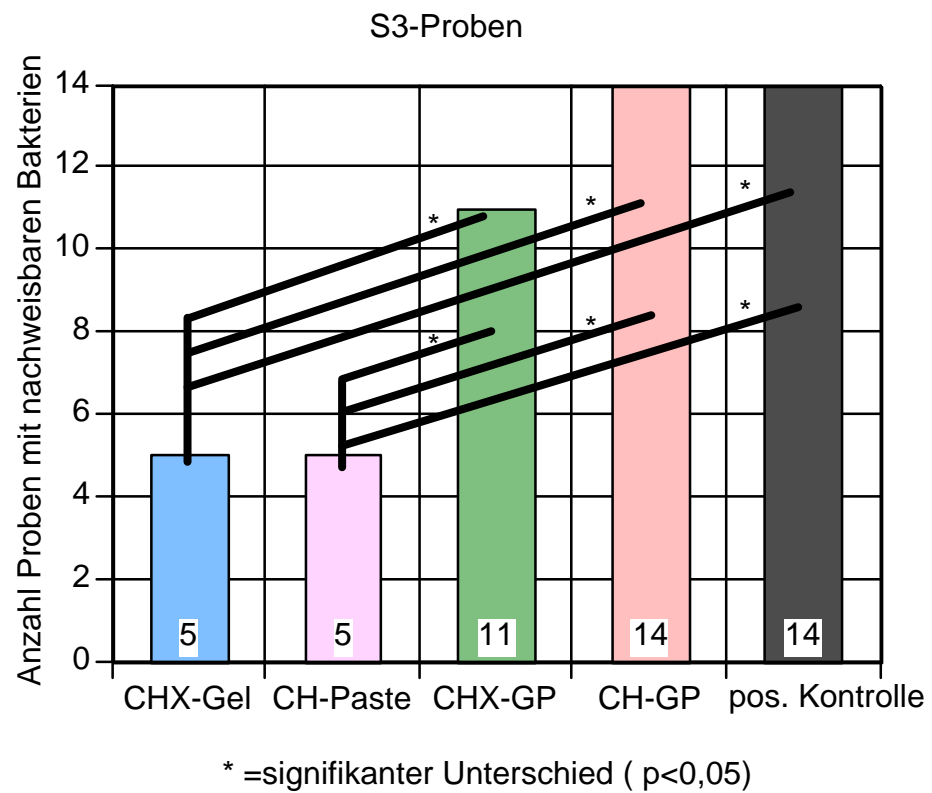


Abbildung 17:
Grafische Darstellung der Anzahl an Proben, die nach zwei Wochen noch positive Kulturen aufwiesen

5.4 Diskussion

Mit diesem selbst entwickelten *In-situ*-Versuchsdesign konnte das Bakterienwachstum in den Wurzelkanälen unter standardisierten Bedingungen stattfinden. Jede der Prothesen enthielt fünf Wurzeln, die während einer Woche identischen Bedingungen ausgesetzt waren. Je eine dieser fünf Wurzeln wurde einer Test- oder der positiven Kontrollgruppe zugeordnet. Da sich die meisten endodontischen Infektionen aus überwiegend anaeroben oder fakultativ anaeroben Spezies zusammensetzen (125), wurde in dieser Studie auf die Kultivierung aerober Bakterien verzichtet. Die Anzahl der Bakterien der S1-Proben entsprach den in *In-vivo*-Experimenten gefundenen Zahlen (10^2 - 10^8 CFU) (285), jedoch war in der vorliegenden Studie die Variationsbreite geringer ($1,2^6$ - $1,1^8$). Dies ist möglicherweise auf die standardisierten Bedingungen zurückzuführen. Unter *In-vivo*-Bedingungen und bei entsprechender Standzeit des infizierten Zahnes ist die Flora im Wurzelkanal sicherlich anders als nach nur einwöchiger Besiedlung durch Mikroorganismen. So konnten Fabricius et al. feststellen, dass sich nach ca. sechs Monaten ein bestimmtes zahlenmäßiges Verhältnis der Mikroorganismen zueinander einstellt (103). Zusätzlich ist es wahrscheinlich, dass die Mikroorganismen innerhalb der einen Woche nicht sehr tief in die Dentintubuli eindringen konnten. Bei *In-vivo*-Situationen ist es denkbar, dass durch lange Besiedlungszeiten eine tiefe Penetration von Mikroorganismen in die Dentintubuli stattfindet. Es ist daher wahrscheinlich, dass die antimikrobielle Wirkung der hier untersuchten Medikamente in solchen Situationen weniger günstig ausfällt.

Nach der Woche, in der in den Testgruppen die medikamentösen Einlagen appliziert worden waren, zeigte sich auch in der positiven Kontrollgruppe bereits eine beträchtliche Reduktion der Bakterienzahl. Da hier nur die anaeroben/fakultativ anaeroben Spezies untersucht wurden, ist es denkbar, dass bereits durch den Austausch der Papierspitzen und den damit einhergehenden Sauerstoffzutritt viele Mikroorganismen abgetötet wurden. Es könnte jedoch auch ein methodisches Problem für diese Reduktion verantwortlich sein: Die Wurzeln waren an ihrer Oberfläche durch Bonding so versiegelt, dass praktisch kein Austausch mit der Umgebung stattfinden konnte. Im Munde ist zumindest eine Diffusion von

Flüssigkeiten aus dem Gewebe in Zement und Dentin denkbar. Diese Flüssigkeit könnte eine Substratzufuhr für Mikroorganismen im Wurzelkanal darstellen, die im vorliegenden Experiment nicht gegeben war. Die Zähne der Testgruppen zeigten jedoch nach dieser Woche signifikant weniger Keime als diejenigen der positiven Kontrollgruppe, was als Hinweis auf die antimikrobielle Wirkung der Medikamente gewertet werden kann.

Aus Wurzeln, in die das 5%ige Chlorhexidin-Gel appliziert wurde, konnten anschließend in 71% der Fälle keine Bakterien mehr isoliert werden. Diese Art der Applikation scheint effektiver zu sein als das Einbringen chlorhexidinhaltiger Guttaperchastifte. Der Unterschied mag darauf zurückzuführen sein, dass sich das Gel besser an die eher unregelmäßigen Wände der Wurzelkanäle adaptieren lässt als die im Vergleich dazu eher harten Guttaperchastifte. Es ist jedoch auch denkbar, dass die Gesamtmenge an verfügbarem CHX im Falle der Gel-Applikation größer ist: Obwohl sowohl das Gel zu 5% aus CHX besteht als auch die Guttaperchaspitze einen 5%igen CHX-Anteil besitzt, ist durch das Gel das gesamte Lumen des Wurzelkanals ausgefüllt, durch die Guttaperchaspitze nur ein Teil. Bei den drei Proben, in denen zum Zeitpunkt von S2 in der Gruppe „CHX-GP“ keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, wurden auch nach einer zusätzlichen Woche ohne weitere Einlage keine Mikroorganismen mehr isoliert. In der Gruppe „CHX-Gel“ war nur in einem der zehn keimfreien Kanäle nach einer Woche wieder bakterielles Wachstum aufgetreten. Dies spricht für die Substantivität, die Chlorhexidin zugeschrieben wird (237, 233). In einer *In-vivo*-Studie untersuchten Klimm et al., inwieweit in Wurzelkanälen mit apikaler Parodontitis nach Aufbereitung und Spülung mit 0,5%iger CHX-Lösung noch Mikroorganismen nachweisbar waren (244). Die Autoren konnten in 88% der Fälle keine Keime isolieren. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie wurden jedoch nach einer Woche keine weiteren Untersuchungen bezüglich einer Re-Infektion mit Mikroorganismen vorgenommen. Huang et al. entwickelten ein Membran-kontrolliertes System auf Polymerbasis, das eine Freisetzung von Chlorhexidin über 24 Tage erlaubt (513). Es wäre interessant, dieses System mit den beiden hier getesteten Systemen zu vergleichen. Trotz der günstigen Ergebnisse für die Gruppen mit Chlorhexidin-Applikation (Gel oder Stifte) sollte in Betracht gezogen werden, dass Chlorhexidin - im Gegensatz zu

Kalziumhydroxid - nicht in der Lage zu sein scheint, bakterielle Endotoxine zu neutralisieren (249).

In der vorliegenden Studie wurden die Medikamente ohne vorherige chemomechanische Bearbeitung in infizierte Wurzelkanäle appliziert, um die eigenständige Wirkung der Medikamente bestimmen zu können. Eine ähnlichen Versuch führten Katebzadeh et al. durch, jedoch *in vivo* und an Hunden (80). Obwohl das Studiendesign stark von dem in der vorliegenden Studie abwich, wurden in beiden Studien ähnliche Ergebnisse gefunden. Katebzadeh et al. applizierten für eine Woche Kalziumhydroxidpaste in infizierte Wurzelkanäle, bevor sie diese mit Wurzelkanalfüllungen obturierten. Nach Opferung der Tiere wurden die apikalen Gewebe der entsprechenden Zähne histologisch untersucht. Im Vergleich zu den negativen (nicht infizierten) Kontrollen fanden die Autoren bei den mit Kalziumhydroxid vorbehandelten Zähnen signifikant mehr entzündete Areale, was zu der Vermutung führen könnte, dass das Medikament nicht vollständig erfolgreich in der Elimination von Bakterien war. Trotzdem fielen die Ergebnisse dieser Testgruppe signifikant besser aus als die der zweiten Testgruppe, in der vor Obturation der Wurzelkanäle kein Medikament appliziert worden war.

In der vorliegenden Studie zeigten die kalziumhydroxidhaltigen Guttaperchastifte die schlechtesten Ergebnisse. Im Vergleich zur positiven Kontrollgruppe konnten jedoch aus den entsprechenden Proben zumindest nach der ersten Woche (S2) signifikant weniger Bakterien isoliert werden. Bei den in der vorliegenden Studie verwendeten Guttaperchastiften handelte es sich nicht um die bisher erhältlichen Kalziumhydroxid-Guttaperchastifte, sondern um die jüngst auf den Markt gekommenen modifizierten Stifte, die im Vergleich zu den bisher erhältlichen eine höhere Konzentration (ca. 52%) an Ca(OH)_2 enthalten. Alle bisherigen Studien, die sich mit den Eigenschaften kalziumhydroxidhaltiger Guttaperchastifte auseinandersetzten, können daher nicht mit der vorliegenden verglichen werden. Distler et al. konnten *in vitro* demonstrieren, dass der Hauptanteil des Kalziumhydroxids innerhalb der ersten 24 Stunden aus den Stiften freigesetzt wurde (306). Danach konnten keine nennenswerten Mengen des Medikamentes mehr nachgewiesen werden. Nerwich et al. zeigten, dass

Kalziumhydroxidpaste für mindestens eine Woche appliziert werden muss, um in allen Wurzelbereichen einen pH-Anstieg zu erzielen (286). Die ungünstigen Ergebnisse nach Applikation der kalziumhydroxidhaltigen Guttaperchastifte könnten auf eine schnelle Freisetzung des gesamten Kalziumhydroxids und seine rasche Pufferung durch das Dentin zurückzuführen sein (514). Da jedoch bereits alles verfügbare Kalziumhydroxid abgegeben wurde, kann kein weiterer Anstieg des pH-Wertes im Wurzelentin hervorgerufen werden, was möglicherweise in einer ungenügenden antibakteriellen Wirkung resultiert. Ferguson et al. untersuchten die fungiziden Eigenschaften verschiedener Testlösungen (203). Die Autoren stellten fest, dass Kalziumhydroxid nur dann fungizide Wirkung zeigte, wenn es als Paste appliziert wurde und wenn es in direktem Kontakt zu den Mikroorganismen stand. Die mangelhafte Adaptation an die Wurzelkanalwände könnte ein Grund für die ungünstigeren Ergebnisse in der Gruppe mit Applikation kalziumhydroxidhaltiger Guttaperchastifte sein.

5.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden *In-situ*-Studie zeigten ein 5%iges Chlorhexidin-Gel und die frisch angemischte Kalziumhydroxidpaste die günstigsten Ergebnisse bezüglich der Reduktion von Mikroorganismen im Wurzelkanal. Aus dieser Sicht kann das 5%ige Chlorhexidin-Gel als zusätzliche medikamentöse Zwischeneinlage betrachtet werden. Kalziumhydroxidhaltige Guttaperchaspitzen zeigten die ungünstigsten Ergebnisse. Im übrigen erlaubt dieses *In-situ*-Modell die Untersuchung antimikrobieller Substanzen im Wurzelkanal unter standardisierten Bedingungen. In weiteren Studien sollte untersucht werden, ob CHX-Gel und Ca(OH)_2 -Paste möglicherweise unterschiedliche Keimspektren zum Ziel haben. Dann könnte eine alternierende Anwendung dieser Medikamente zu einem synergistischen Effekt führen.

6 Studie 3:

Die bakterielle Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen in Kombination mit adhäsiven Deckfüllungen oder provisorischen Füllungsmaterialien

6.1 Zielstellung

Eine Wurzelkanalbehandlung verfolgt den Zweck, einer apikalen Parodontitis vorzubeugen oder sie auszuheilen. Ein infizierter Wurzelkanal muss desinfiziert, geformt und mit einem sogenannten hermetischen Verschluss obturiert werden. Diese Wurzelkanalfüllung sollte zusammen mit der koronalen Versorgung in der Lage sein, orale Mikroorganismen an der Penetration bis ins apikale Gewebe zu hindern. Viele Studien untersuchten die apikale Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen. In jüngerer Zeit konzentrierte sich jedoch das Interesse der Forschung auf die koronale Dichtigkeit. Ray und Trope demonstrierten mittels einer radiologischen Untersuchung eine Korrelation zwischen dem periapikalen Status wurzelkanalgefüllter Zähne und ihrer koronalen Versorgung (476). Es konnte gezeigt werden, dass Wurzelkanalfüllungen ohne koronale Deckfüllung keine ausreichende Barriere für Mikroorganismen darstellen (464, 465, 515, 478, 516, 421, 483).

Nach einer Wurzelkanalbehandlung benötigt der Zahn bis zum Erhalt der definitiven Restauration eine koronale Zwischenversorgung. In einer früheren *In-vitro*-Studie wurde die Dichtigkeit wurzelkanalgefüllter Zähne in Kombination mit unterschiedlichen provisorischen Versorgungsmaterialien untersucht (517). Während der einmonatigen Beobachtungsphase konnte nur Glasionomierzement Bakterien am Eindringen hindern.

In manchen Fällen muss ein wurzelkanalgefüllter Zahn über mehrere Monate beobachtet werden, bevor die koronale Versorgung fertiggestellt werden kann. Für diesen Zweck werden Materialien benötigt, die ausreichend Schutz vor einer Re-Infektion des Wurzelkanalsystems gewährleisten. Da endodontisch behandelte Zähne oftmals eine Aufbaufüllung benötigen, bevor laborgefertigte Restaurationen eingegliedert werden können, wäre es ergonomisch, diese Aufbaufüllungen bereits unmittelbar nach Wurzelkanalfüllung als provisorische Langzeitversorgung zu

applizieren. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Bakteriendichtigkeit wurzelkanalgefüllter Zähne zu untersuchen, die koronal entweder mit herkömmlichen provisorischen Füllungsmaterialien oder mit adhäsiven Aufbaumaterialien versorgt wurden. Dies sollte im Rahmen eines Langzeitversuches erfolgen.

6.2 Material und Methode

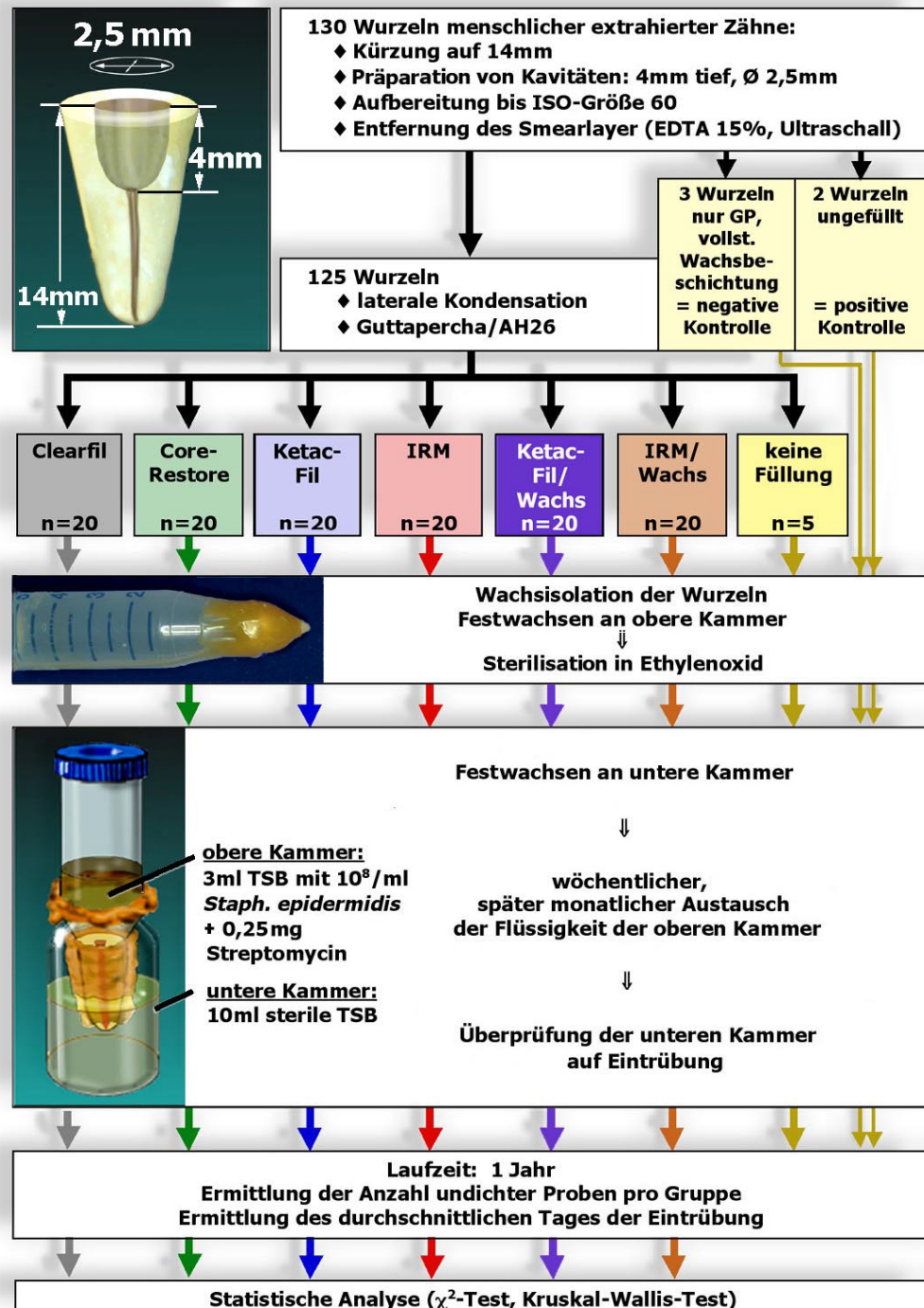


Abbildung 18:
Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Studie 3

6.2.1 Präparation der Zähne

Von 130 extrahierten menschlichen einwurzligen Zähnen, die für unterschiedliche Zeitintervalle in 20%igem Alkohol gelagert worden waren, wurden die Kronen abgetrennt und verworfen (Abb. 18). Die verbliebenen Wurzeln wurden von koronal auf eine einheitliche Länge von 14mm gekürzt. Mit einem Diamantschleifer von 2,5mm Durchmesser wurden 4mm tiefe standardisierte Kavitäten in die koronalen Anteile der Wurzeln präpariert. Diese Kavitäten wurden zur Simulation klinischer Zugangskavitäten angefertigt. Die Wurzeln wurden bis zu einer ISO 60 Masterfeile aufbereitet, bei einer Aufbereitungslänge, die 1mm kürzer als die Wurzellänge war. Die Wurzelkanäle wurden dann mit der Step-back-Technik konisch präpariert. Die gesamte Aufbereitung wurde durch Einsatz von 2,5%igem NaOCl unterstützt. Ein Instrument der ISO-Größe 15 wurde vorsichtig 1,5mm über den Apex hinaus geschoben, um die apikale Durchgängigkeit zu gewährleisten. Die Wurzelkanäle wurden während 20 Sekunden mit Ultraschall und 15%igem EDTA behandelt, um den Smearlayer von den Wurzelkanalwänden zu entfernen. 120 der Wurzeln wurden mittels lateraler Kondensation mit AH26 (DeTrey, Konstanz D) als Sealer gefüllt und anschließend sechs experimentellen Gruppen zugeteilt (je n=20).



Abbildung 19:

Die in Studie 3 verwendeten Materialien Clearfil, CoreRestore, Ketac-Fil und IRM

Die erste Gruppe („CF“) wurde koronal mit dem Aufbaumaterial Clearfil (Kuraray, Osaka, Jp) versorgt (Abb. 19), nachdem die Kavitäten geätzt und mit New Bond (Kuraray, Osaka, Jp) behandelt worden waren. Die zweite Gruppe („CR“) wurde mit einem weiteren Aufbaumaterial gefüllt, nämlich CoreRestore (Kerr, Karlsruhe, D), ebenfalls nach Ätzung und Bonding, jedoch mit OptiBond Solo (Kerr, Karlsruhe, D). Die dritte Gruppe („KF“) wurde mit dem Glasionomerzement Ketac-Fil (ESPE, Seefeld, D) verschlossen. In der vierten Gruppe („I“) wurde das kunststoffverstärkte provisorische Füllmaterial IRM (DeTrey, Konstanz, D) appliziert. Da in früheren Studien erfolgreich Klebewachs als Versiegler gegen die Bakterien, u.a. auch für die negativen Kontrollgruppen verwendet wurde, erschien es sinnvoll, noch zwei weitere experimentelle Gruppen zu bilden, bei denen Wachs in die Zugangskavitäten appliziert werden sollte. In der fünften Gruppe („KF/Wachs“) wurde auf den Kanaleingang eine dünne Schicht Klebewachs appliziert, bevor die restliche Kavität mit Ketac-Fil verschlossen wurde. In der sechsten Gruppe („I/Wachs“) wurde ebenso verfahren, nur dass statt des Glasionomerzementes IRM verwendet wurde.

Fünf der verbleibenden 10 Zähne wurden mit AH26 und Guttapercha lateral kondensiert, es wurden jedoch keine Deckfüllungen appliziert, zwei Wurzeln blieben ungefüllt und dienten als positive Kontrollen. In drei Wurzeln wurden einige Guttaperchastifte eingebracht; anschließend wurden die gesamten Wurzeln vollständig mit Klebewachs ummantelt, sie dienten als negative Kontrollen. Alle Zähne wurden für zwei Wochen bei 100%iger Luftfeuchtigkeit und 37°C gelagert, um ein vollständiges Abbinden bzw. Aushärten der Füllungsmaterialien zu gewährleisten.

6.2.2 Bakteriell Setup

Die Wurzeln wurden unter Aussparung der koronalen Stirnseite und der apikalen 1-2mm mit Klebewachs überzogen. Die anschließende Befestigung an 15ml Polyethylen-Teströhrchen (=obere Kammern) ließ sie mit dem Apex aus einer Perforation aus der unteren Spitze der Röhrchen herausragen. Die gesamten Aufbauten wurde in Ethylenoxid sterilisiert, wobei in die Teströhrchen in Wasser

getränkte Tupfer eingelegt wurden, um eine gewisse Feuchtigkeit zu etablieren, die einer Sprungbildung an den Zähnen vorbeugen sollte. Nach dem Sterilisationsvorgang wurden die Aufbauten mit Klebewachs auf Rollrandgläsern (=untere Kammern) befestigt, die mit 10ml steriler klarer Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) gefüllt waren (Abb. 20). Dadurch waren die unteren Kammern für den weiteren Verlauf des Experimentes hermetisch von der Außenwelt abgeschlossen. Die Wurzelspitzen hingen hierbei etwa 5-6mm in der TSB. Die oberen Kammern wurden mit je 3ml TSB mit 0,25mg Streptomycin/ml und einem gegen Streptomycin resistenten Keim der Species *Staphylococcus epidermidis* in einer Konzentration von 10^8 CFU/ml inokuliert.



Abbildung 20:
Experimenteller Aufbau des Dichtigkeitstests von Wurzelkanalfüllungen mittels Bakterien

Alle Aufbauten wurden bei 37°C inkubiert und die unteren Kammern wurden täglich auf Eintrübung als Indikator für bakterielles Wachstum überprüft. Nach drei Monaten wurde diese Überprüfung nur noch dreimal wöchentlich vorgenommen. Die bakterielle Bouillon wurde alle vier Wochen ausgetauscht. Zu Beginn des Experimentes wurde wöchentlich per Stichprobe die Vitalität der Bakterien aus den oberen Kammern durch Bebrütung auf Columbia-Blut-Agar-Platten getestet. Nach zwei Monaten fand diese Überprüfung nur noch jede vierte Woche statt. Trotz der größeren Zeitintervalle zwischen den Überprüfungen konnte eine gleichbleibende Anzahl der vitalen Mikroorganismen beobachtet werden.

Trat eine Eintrübung in der unteren Kammer auf, so wurde der Tag der Eintrübung notiert, die Versiegelung der unteren Kammer aufgebrochen und Flüssigkeiten aus oberer und unterer Kammer zur Bebrütung entnommen. Das Experiment wurde zwölf Monate lang durchgeführt.

Nach Gewinnung der Daten wurde eine statistische Analyse mit dem χ^2 -Test für die Anzahl der trüben Proben pro Gruppe bzw. dem Kruskal-Wallis-Test für den durchschnittlichen Tag der Eintrübung durchgeführt. Hierfür wurde das Statistikprogramm SPSS 8. 0 auf PC unter Windows 98 verwendet.

6.3 Ergebnisse

Die negativen Kontrollen, die vollständig mit Wachs überzogen waren, zeigten während der gesamten Versuchsdauer keine Eintrübung in ihren unteren Kammern. In ihren oberen Kammern befanden sich während der gesamten Beobachtungszeit vitale Keime in gleichbleibender Anzahl. Die zwei leeren, negativen Kontrollzähne ließen am zweiten Tag eine Eintrübung der unteren Kammer zu. Die fünf gefüllten Wurzeln, die keine Deckfüllung erhalten hatten, zeigten alle innerhalb des ersten Monats eine Eintrübung der unteren Kammer. Je eine Probe aus der Gruppe „KF/Wachs“ und eine aus der „CR“ musste verworfen werden, da die Wachsversiegelung zwischen oberem Aufbau und unterer Kammer zerbrochen war.

Alle unteren Kammern mit Eintrübung enthielten Flüssigkeiten, die wachstumsfähige Bakterien beherbergten. In den Fällen, in denen die unteren

Kammern am Ende des Experimentes noch klare TSB enthielten, konnten keine vitalen Bakterien nachgewiesen werden. In zwei dieser Fälle jedoch konnten durch Gram-Färbung bakterielle Überreste dargestellt werden.

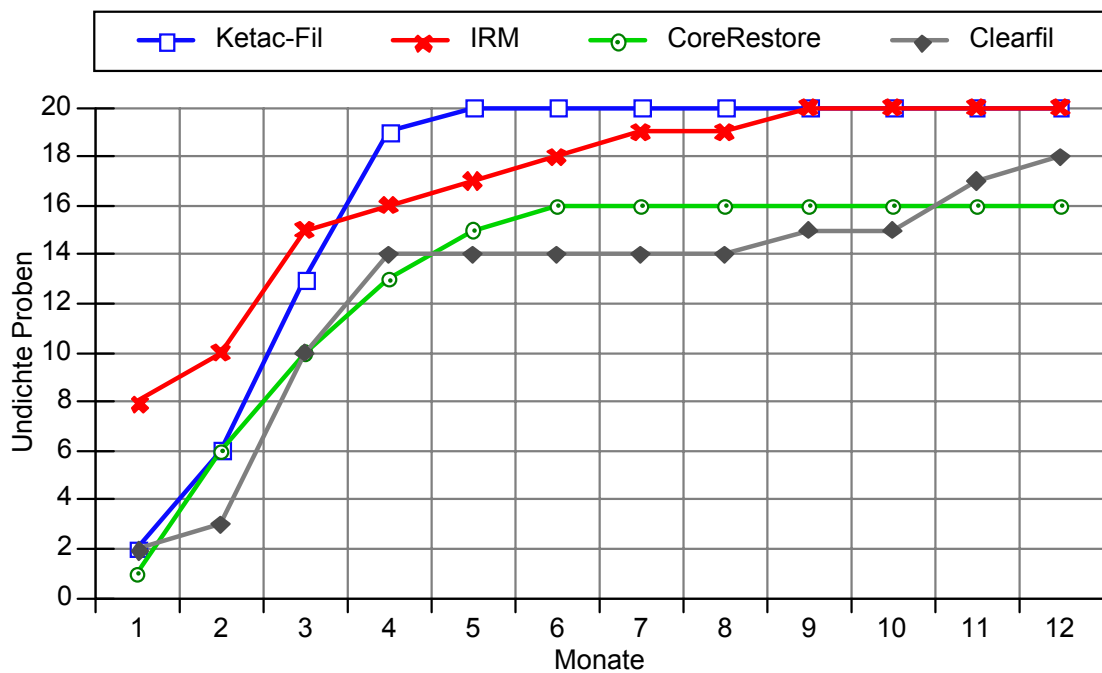
Für den durchschnittlichen Tag der Eintrübung (Tab. 2) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Testgruppen. Die Anzahl undichter Proben pro Gruppe und die signifikanten Unterschiede können aus den Abbildungen 21 und 22 ersehen werden.

Tabelle 2:

Anzahl undichter Proben und durchschnittlicher Tag (Median) der Eintrübung pro Gruppe

Material	Undichte Proben/ untersuchte Proben	Durchschnittlicher Tag der Eintrübung
Clearfil	18/20	79
CoreRestore	16/19	78
Ketac-Fil	20/20	71
IRM	20/20	61
Ketac-Fil/Wachs	19/19	106
IRM/Wachs	20/20	82

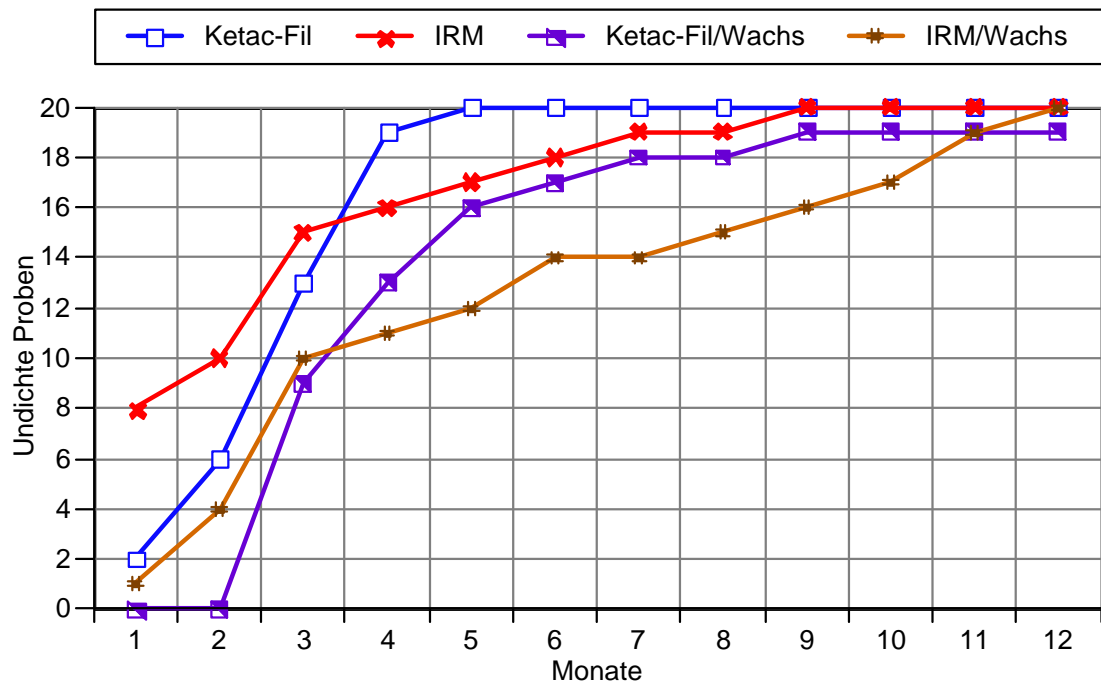
Am Ende des Versuches erwiesen sich nur drei Proben aus der Gruppe „CR“ und zwei Proben aus der Gruppe „CF“ als bakteriendicht, insgesamt also fünf Proben aus 120 getesteten. Bei Beendung des Experimentes konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl undichter Proben zwischen den Gruppen festgestellt werden. Bis Monat 10 zeigte die Gruppe „CF“ für mehrere Monate signifikant weniger undichte Proben als die Gruppe „KF“ oder die Gruppe „I“. Die stärkste Zunahme an undichten Proben konnte in den ersten vier Monaten beobachtet werden. Die Hälfte der mit IRM verschlossenen Proben war innerhalb von zwei Monaten undicht. Die Gruppe der mit Ketac-Fil versorgten Zähne war die erste, in der alle Proben undicht waren. Letzteres trat nach dem fünften Monat ein.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CF	CF		CF	CF	CF	CF	CF	CF	CF		
KF	KF		KF	KF	KF	KF	KF	KF	KF		
I	I		I	I	I	I	I	I	I		
CR	CR		CR	CR	CR	CR	CR	CR	CR		
— = signifikanter Unterschied (p<0,05)											
CF=Clearfil • CR= CoreRestore • KF= Ketac-Fil • I= IRM											

Abbildung 21:

Darstellung der Anzahl undichter Proben pro Gruppe. Um eine gute Übersichtlichkeit zu wahren, wurden in dieser Grafik nur die Gruppen mit adhäsiver und provisorischer Versorgung aufgeführt. Die Gruppen, in denen die Wurzeln mit Wachs verschlossen worden waren, sind in Abb. 22 aufgetragen.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
KF/W	KF/W		KF/W	KF/W	KF/W	KF/W	KF/W				
I/W	I/W		I/W	I/W	I/W	I/W	I/W				
KF	KF		KF	KF	KF	KF	KF				
I	I		I	I	I	I	I				
— = signifikanter Unterschied (p<0,05)											
I/W= IRM/Wachs • KF/W= Ketac-Fil/Wachs • KF= Ketac-Fil • I= IRM •											

Abbildung 22:

Darstellung der Anzahl undichter Proben pro Gruppe. Aufgetragen sind die mit Wachs und die mit provisorischen Materialien verschlossenen Wurzeln, die der Übersichtlichkeit halber getrennt von den anderen Gruppen aufgeführt wurden.

6.4 Diskussion

Für dieses Experiment wurde *Staphylococcus epidermidis* gewählt, da diese Spezies aus Wurzelkanälen isoliert wurde (163), einfach zu kultivieren ist und in früheren Experimenten mit ähnlichem Versuchsaufbau bereits erfolgreich eingesetzt wurde (464, 465, 421). Für die Deckfüllung wurde u.a. IRM gewählt, da es ein häufig verwendetes provisorisches Füllungsmaterial ist. Glasionomierzement zeigte bereits gute Ergebnisse in einer früheren Studie bei einer Beobachtungszeit von einem Monat (517). In der vorliegenden Studie sollte seine Dichtigkeit im Langzeitversuch erprobt werden. In früheren und in dieser Studie wurden einige Proben vollständig mit Wachs überzogen und als negative Kontrollen verwendet. Damit sollte geprüft werden, ob alle wachsversiegelten Flächen bakteriendicht abgeschlossen waren. Diese negativen Kontrollzähne erwiesen sich in allen Fällen als dicht. Diese Beobachtung veranlasste zu untersuchen, ob nicht auch eine Wachsschicht in den Zugangskavitäten zu einer verbesserten Dichtigkeit führen könne. Aus diesem Grunde wurde in zwei der experimentellen Gruppen auf den Kanaleingang der Wurzeln eine dünne Wachsschicht aufgetragen, bevor zusätzliches provisorisches Füllungsmaterial eingebracht wurde.

Dieses Studiendesign stellt die ungünstigste Situation dar: Wenn nur ein einziger Mikroorganismus die untere Kammer erreicht, ist es nur eine Frage der Zeit, bis sich die klare Bouillon eintrübt und damit die Probe als undicht gewertet wird. *In vivo* würde ein einzelnes Bakterium mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Körperabwehr eliminiert werden. Friedman et al. führten *In-vivo*-Experimente an Hunden durch (481, 482). Sie brachten autologe Plaque in die Zugangskavitäten wurzelkanalgefüllter Zähne ein und verschlossen diese Kavitäten anschließend. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden die Tiere geopfert, es wurden die apikalen Gewebe entnommen und histologische sowie radiologische Auswertungen durchgeführt. Eine solche Methode hat sicherlich eine wertvollere Aussagekraft bezüglich der Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen als jede *In-vitro*-Methode. Andererseits kann es von Interesse sein, Grundlagen *in vitro* zu ermitteln, bevor ein Tierexperiment durchgeführt wird und ein Studiendesign wie das der vorliegenden Studie kann einen gewissen Vorhersagewert aufweisen.

Clearfil und CoreRestore wurden ausgewählt, da es sinnvoll erschien, zu untersuchen, ob adhäsiv eingesetzte Füllungen eine höhere Dichtigkeit besitzen als nicht adhäsiv gelegte Füllungen. Felton et al. untersuchten die Inhibierung bakteriellen Wachstums unter Kompositfüllungen, die mit oder ohne GLUMA vorbehandelt worden waren (518). In keiner der mit GLUMA behandelten Kavitäten konnten Bakterien nachgewiesen werden. Hörsted-Bindslev fand ähnliche Ergebnisse, als er mit GLUMA behandelte Kavitäten bei Affen untersuchte (519).

Überraschenderweise zeigten die adhäsiv gelegten Materialien in der vorliegenden Studie nach 12 Monaten keine bessere Dichtigkeit im Vergleich zu den anderen Materialgruppen. Deveau et al. untersuchten die Dichtigkeit verschiedener provisorischer Füllungsmaterialien gegen Bakterien, allerdings nur in der Zahnkrone, Wurzelkanalfüllungen waren nicht integriert (520). Nach 21 Tagen waren 15% der IRM-Proben undicht. Obwohl die Autoren darstellen, dass Thermocycling keinen Einfluss auf die Dichtigkeit der Füllungen hat, fanden sich in der Gruppe mit IRM-Füllungen nach Thermocycling nur noch 65% dichte Proben und in der Gruppe mit Fermitfüllungen, die vor Thermocycling 90% dichte Proben hatte, fanden sich danach 60% dichte Proben. In der vorliegenden Studie wurde kein Thermocycling durchgeführt, da dies möglicherweise zu einer Schädigung der Guttaperchafüllungen geführt hätte. Es ist jedoch denkbar, dass die Deckfüllungen der Testgruppen unter thermischer und mechanischer Belastung noch schlechtere Ergebnisse bezüglich der Dichtigkeit erzielt hätten.

Pisano et al. untersuchten die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen, die mit Guttapercha und Roth Sealer obturiert waren. In die Kanaleingänge applizierten die Autoren Cavit, IRM oder Super-EBA-Zement (521). Nach 90 Tagen erwiesen sich 15% der mit Cavit versehenen Zähne und 35% der mit IRM oder Super-EBA-versehenen Zähne als undicht gegen Bakterien. In der vorliegenden Studie waren es nach 90 Tagen 75% der mit IRM versorgten Zähne. Diese Diskrepanz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Pisano et al. etwa 3,5 mm des koronalen Anteiles der Wurzelkanalfüllungen entfernten und in den entstandenen Hohlraum ohne weitere Kavitätenpräparation die provisorischen Füllungsmaterialien einbrachten. In der vorliegenden Studie wurden Kavitäten mit einem Durchmesser

von ca. 2,5mm präpariert, um Zugangskavitäten zu simulieren. Es ist denkbar, dass diese im Vergleich zu Pisano et al. größere Durchmesser zu stärkeren Unregelmäßigkeiten im Dimensionsverhalten des provisorischen Füllungsmaterials geführt hat.

Die hier verwendeten Aufbaumaterialien waren chemisch härtende Komposite, die in einer Schicht („bulk technique“) appliziert wurden. Dies könnte die Auswirkungen der Schrumpfung verstärkt und damit zu Spaltbildung geführt haben. Bei Anwendung eines lichthärtenden Materials in mehreren Schichten („increment technique“) hätte dieses Problem kompensiert werden können. Lundin et al. präparierten Klasse-II-Kavitäten in kariesfreie Prämolaren, die aus kieferorthopädischen Gründen zur Extraktion vorgesehen waren (522). Anschließend verschlossen sie die Defekte mit GLUMA und einem lichthärtenden Komposit. Obwohl hier ein lichthärtendes Material eingesetzt wurde, konnten die Autoren innerhalb von 1-32 Tagen eine bakterielle Invasion unter den Füllungen nachweisen. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie waren die Kavitäten jedoch größer, komplexer und *in vivo* durchgeführt. Dies könnte zu gewissen Imperfektionen der Füllungsränder geführt haben. Die Füllungsränder lagen in der vorliegenden Studie ausschließlich im Dentin, was ein weiterer Grund für das Versagen der adhäsiven Materialien in der vorliegenden Studie sein könnte. Durch die initiale Abtrennung der Zahnkronen war kein Zahnschmelz mehr vorhanden, der eventuell eine günstigere Randdichtigkeit ergeben hätte. Diese Studie repräsentiert somit den klinisch schwierigen Fall tief zerstörter Zähne mit geringen oder gar keinen koronalen Anteilen.

In allen negativen Kontrollzähnen, die vollständig mit Wachs überzogen worden waren, konnte in der unteren Kammer kein bakterielles Wachstum nachgewiesen werden. In den Gruppen „I/Wachs“ und „KF/Wachs“ wurde das Wachs nur in die Zugangskavitäten auf den Kanaleingang appliziert. Alle diese experimentellen Proben erwiesen sich am Ende der Beobachtungszeit als undicht. Es fragt sich, ob die Bakterien entlang der Füllungs-Dentin-Grenze nach apikal penetriert sind oder durch das Dentin. Dies wiederum würde bedeuten, dass die Ergebnisse dieser Studie zufällig waren, abhängig davon, wie permeabel das Dentin jeder einzelnen

Wurzel war. In einer früheren Studie, in der die Beobachtungszeit bei einem Monat lag (517), zeigten die Gruppen der mit IRM bzw. Ketac-Fil gefüllten Zähne jedoch vergleichbare Anzahl undichter Proben wie in der vorliegenden Studie: Die mit IRM versorgte Gruppe hatte von 20 getesteten Proben 11 undichte, die mit Ketac-Fil versorgten Zähne wiesen 1 undichte von 20 auf, in der vorliegenden Studie waren es für IRM 8 von 20 und für Ketac-Fil 2 von 20, so dass von einer gewissen Reproduzierbarkeit und damit nicht von einer Zufälligkeit der Ergebnisse ausgegangen werden kann.

In zwei unteren Kammern der während der gesamten Studienzeit dichten Proben konnten durch Gramfärbung Reste bakterieller Zellen nachgewiesen werden. Es kann spekuliert werden, dass eine bestimmte (vermutlich geringe) Menge an Bakterien die untere Kammer erreichte, jedoch nicht überlebensfähig bzw. vermehrungsfähig war. Trotz der Erkenntnis, dass bakterielle Zellwandbestandteile in der Lage sind, Entzündungsreaktionen hervorzurufen und aufrecht zu erhalten (25), ist bis heute unbekannt, wie viele solcher Bestandteile nötig sind, um eine Entzündungsreaktion zu provozieren. Aus diesem Grunde kann nicht gesagt werden, ob die Bakterientrümmen, die in den negativen Proben gefunden wurden, von klinischer Relevanz sind.

Um eine gewisse Standardisierung zu erzielen, wurden die Wurzeln auf eine einheitliche Länge von 14mm gekürzt. 4mm dienten hierbei als Zugangskavität, 10mm waren für die Wurzelkanalfüllung vorgesehen. In einer klinischen Situation sind die Wurzeln oder Zähne in der Regel länger. Es ist denkbar, dass ein längerer Zahn zu einer größeren Versiegelungsfläche und damit einer verbesserten Dichtigkeit im Vergleich zur Situation der vorliegenden Studie führt.

6.5 Schlussfolgerungen

Innerhalb der ersten vier Wochen konnten alle getesteten Materialien *in vitro* einen akzeptablen Schutz vor bakterieller Penetration bieten. Auf Langzeit-Basis dürfte von den getesteten Materialien Clearfil als Material der Wahl betrachtet werden. Es ist jedoch in Betracht zu ziehen, dass auch in den mit Clearfil versorgten Zähnen fast alle nach einem Jahr undicht waren. Daher ist nach wie vor zu empfehlen, das Zeitintervall zwischen Wurzelkanalfüllung und definitiver Versorgung so gering wie möglich zu halten.

7 Studie 4:

Untersuchungen zur bakteriellen Penetration in wurzelkanalgefüllten Zähnen nach Applikation unterschiedlicher medikamentöser Einlagen

7.1 Zielstellung

Bei Vorliegen einer apikalen Parodontitis zielt die Wurzelkanalbehandlung auf die Elimination von Bakterien im Wurzelkanal ab. Dies kann durch mechanische Aufbereitung, antibakterielle Spüllösungen und medikamentöse Einlagen bewerkstelligt werden. Durch rein mechanische Aufbereitung kann das Wurzelkanalsystem nicht keimfrei gemacht werden (175). Die zusätzliche Verwendung von Natriumhypochlorit kann die Desinfektion verbessern (116). Die überzeugendsten Ergebnisse können jedoch durch Kombination von Aufbereitung, desinfizierender Spüllösung und medikamentöser Einlage für mindestens eine Woche erzielt werden (285).

Die anschließende Wurzelkanalfüllung sollte eine bakteriendichte Versiegelung des Wurzelkanalsystemes herstellen, um eine Re-Infektion der periapikalen Gewebe zu verhindern. Viele Studien haben die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen untersucht, indem sie die apikalen Bereiche der Wurzeln mit Farbstoffen, Radioisotopen oder anderen Indikatoren überprüft haben. Ray und Trope beobachteten eine positive Korrelation zwischen dem radiologischen Status koronaler Restaurationen und dem periapikalen Status wurzelkanalgefüllter Zähne (476). Torabinejad et al. und Khayat et al. untersuchten die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen mittels Bakterien. Nach drei Monaten waren alle Wurzelkanalfüllungen undicht, unabhängig von der differentiellen Motilität der Bakterien (464, 465). Es ist denkbar, dass eine fortdauernde apikale Parodontitis in manchen Fällen ihre Ursache nicht in den Restbakterien im Wurzelkanalsystem hat, sondern in Bakterien, die nach Desinfektion des Wurzelkanalsystems wieder von koronal an die Wurzelspitze vorgedrungen sind und die somit die gerade ausheilenden periapikalen Gewebe wieder in ein Entzündungsgeschehen überführen. Es scheint wichtig, kürzlich gefüllte Wurzelkanäle schnell mit einer dichten Deckfüllung zu versorgen (483). Wurzelkanalgefüllte Zähne konnten auch

von Bakterien penetriert werden, wenn sie koronal durch provisorische Füllungsmaterialien (Cavit, IRM) verschlossen waren (517). Diese und andere Studien mit ähnlichem Design wurden immer ohne vorherige medikamentöse Einlage durchgeführt.

Über Chlorhexidin ist bekannt, dass es an Zahnhartsubstanzen adsorbiert (523-525) und dass es einen antimikrobiellen Residualeffekt besitzt (233). Eine Medikation mit Chlorhexidin vor der Abfüllung des Wurzelkanales könnte also durchaus einen postobturativen antimikrobiellen Effekt haben. Ähnliches gilt für Tetracyclin und seine Derivate (526). Eine Kalziumhydroxid-Anwendung resultiert im Wurzelkanal in einer Erhöhung des pH-Wertes bis in die peripheren Wurzelregionen (259, 286). Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwieweit die Applikation medikamentöser Einlagen vor der Wurzelkanalfüllung deren Dichtigkeit gegen Bakterien beeinflusst.

7.2 Material und Methode

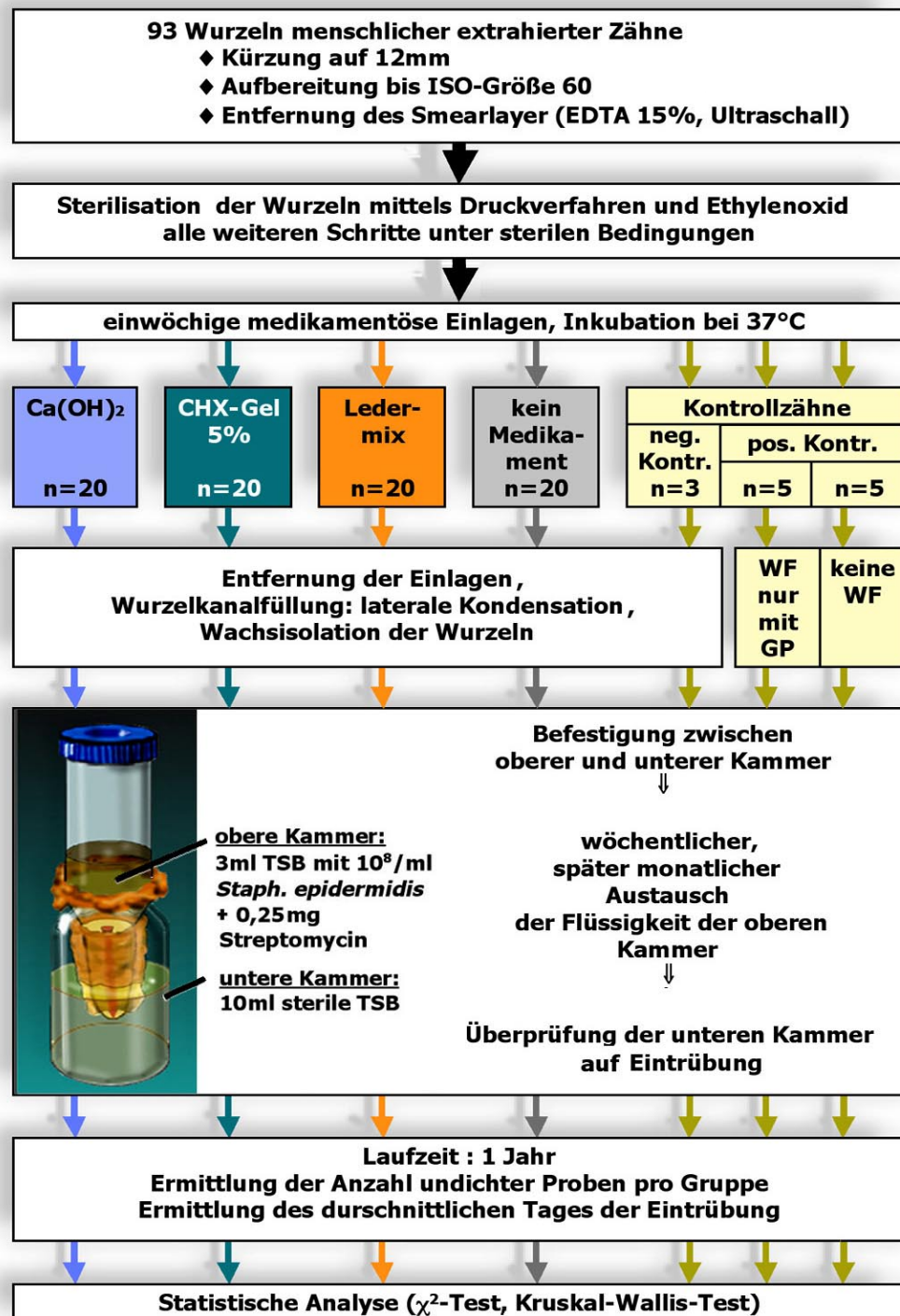


Abbildung 23:
Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Studie 4

Von 93 extrahierten einwurzigen menschlichen Zähnen, die für unterschiedliche Zeitintervalle in 20%igem Ethanol gelagert waren, wurden die Kronen an der Schmelz-Zement-Grenze abgetrennt (Abb. 23). Die Wurzeln wurden auf eine einheitliche Länge von etwa 12 mm zurückgeschnitten. Sie wurden bis zu einer Masterfeile der ISO-Größe 60 aufbereitet wobei 2,5%ige NaOCl-Lösung appliziert wurde. Anschließend wurden die Wurzelkanäle mit der Step-back-Technik konisch gestaltet. Um den durch die Aufbereitung entstandenen Smearlayer zu entfernen, wurden die Wurzeln für 20 Sekunden mit 15%iger EDTA-Lösung und Ultraschall behandelt. Die Wurzeln wurden durch ein Drucksterilisationsverfahren und anschließend unter konstanter Feuchthaltung in Ethylenoxid sterilisiert. Zwei Proben wurden nach Sterilisation anaerob, zwei weitere aerob bebrütet, um die Sterilität zu verifizieren. Alle weiteren Schritte wurden von diesem Zeitpunkt an ausschließlich unter sterilen Bedingungen unter der laminaren Flow durchgeführt.

Die Wurzeln wurden in vier Testgruppen (je n=20) und mehrere Kontrollgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe („CHX“) wurde mit einem experimentellen 5%igen Chlorhexidin-Gel mittels Lentulo beschickt. Die zweite Gruppe („LM“) wurde mit Ledermix (Lederle, Wolfratshausen, D), einer Antibiotikasalbe mit Doxycyclin- und Prednisolon-Bestandteilen gefüllt. In der dritten Gruppe („Ca(OH)₂“) wurde eine frische Mischung aus Ca(OH)₂ und sterilem Wasser in die Kanäle eingebracht, die vierte Gruppe („kein Medikament“) wurde ungefüllt belassen. Die Kanalöffnungen wurden danach mit Wattepellets verschlossen und für eine Woche bei 37°C und 100%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einer Woche wurden die Medikamente mit einer Feile der ISO-Größe 60 entfernt, gefolgt von 10ml NaOCl-Spülung. Die Wurzeln wurden mit lateraler Kondensation unter Verwendung von Guttaperchaspitzen und AH26 gefüllt. Fünf Wurzeln blieben ungefüllt und fünf Wurzeln wurden ohne Sealer, nur mit Guttapercha gefüllt; diese zehn Zähne dienten als positive Kontrolle. Drei Wurzeln wurden behandelt wie die Zähne aus der experimentellen Gruppe „kein Medikament“, wurden jedoch danach vollständig mit Wachs überzogen; sie dienten als negative Kontrolle.

Die übrigen Wurzeln wurden ebenfalls mit Klebewachs überzogen, bei ihnen wurden jedoch die koronale Stirnfläche und die apikalen 1-2mm ausgespart. Sie

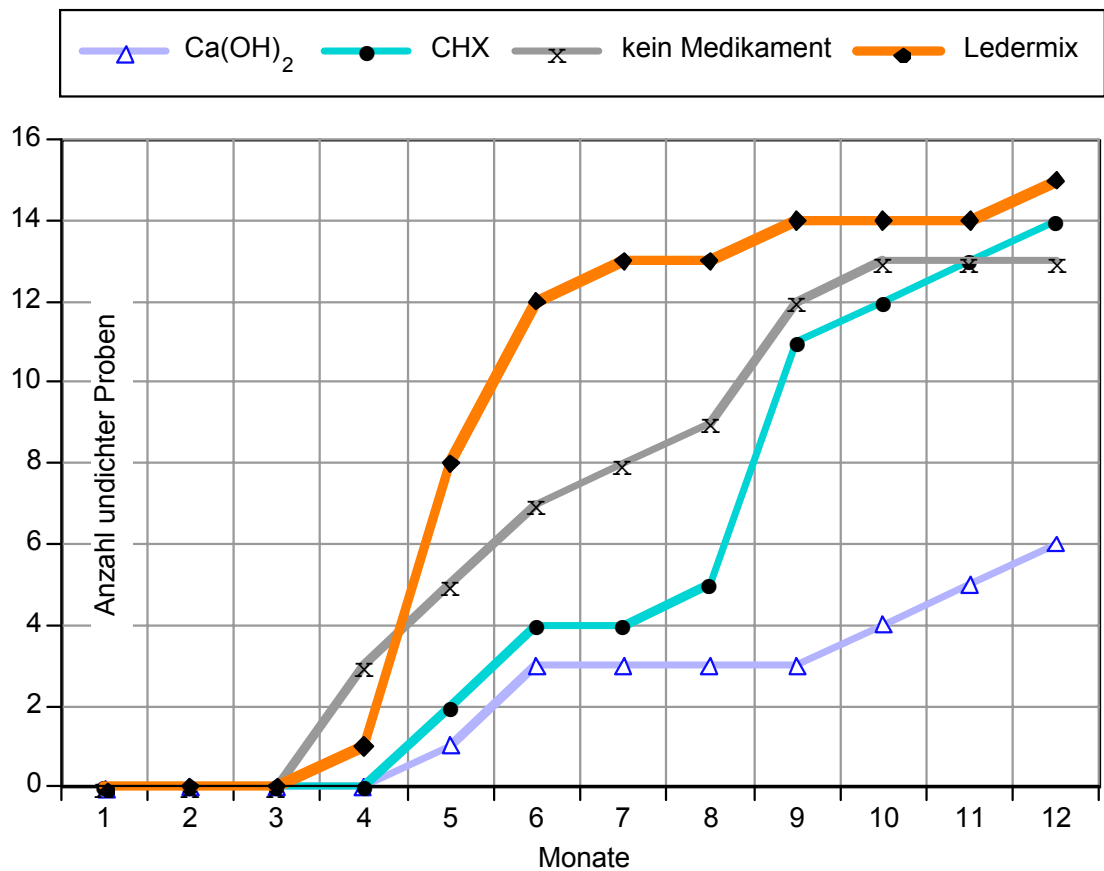
wurden so an 15ml Polyethylenröhrchen (= obere Kammer) befestigt, dass sie mit dem Apex aus einer Perforation am unteren Ende der Teströhrchen herausragten. Diese Aufbauten wurden ebenfalls mit Klebewachs auf Rollrandgläser (=untere Kammer) montiert, die mit 10ml steriler klarer Tryptikase-Soja-Bouillon (TSB) gefüllt waren. Die oberen Kammern wurden mit 3ml TSB inokuliert, die zusätzlich 0,25mg Streptomycin/ml und eine gegen Streptomycin resistente *Staphylococcus epidermidis* Spezies in einer Konzentration von 10^8 CFU/ml enthielten. Alle fertigen Aufbauten wurden bei 37°C inkubiert und die unteren Kammern wurden täglich auf Eintrübung untersucht, ein Indikator, der bakterielles Wachstum anzeigt. Nach drei Monaten wurden die Aufbauten nur noch dreimal pro Woche überprüft. Die bakterielle Bouillon in den oberen Kammern wurde jede vierte Woche ausgetauscht. Die Vitalität der Bakterien wurde anfänglich jede Woche durch Bebrütung auf Columbia-Blut-Agar-Platten überprüft, nach zwei Monaten nur noch jede vierte Woche. Im Falle einer Eintrübung der unteren Kammer wurde deren hermetische Versiegelung aufgebrochen und es wurde Flüssigkeit aus oberer und unterer Kammer auf Columbia-Blut-Agar-Platten bebrütet, um die Vitalität der Mikroorganismen zu verifizieren und um zu überprüfen, ob es sich um die identische Spezies handelte. Es wurde der Tag der Eintrübung notiert. Das Experiment wurde ein Jahr lang durchgeführt. Die Daten wurden statistisch unter Verwendung des χ^2 -Tests mit dem Programm SPSS 8.0 unter Windows 98 auf PC analysiert.

7.3 Ergebnisse

Eine Probe aus der Gruppe „CHX“ musste verworfen werden, da sich die Versiegelung zwischen oberer und unterer Kammer gelöst hatte. Die Anzahl undichter Proben pro Gruppe kann aus Abbildung 24 gesehen werden. Alle positiven Kontrollproben zeigten innerhalb der ersten vier Tage bakterielles Wachstum in der unteren Kammer. Die negativen Kontrollproben zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraumes klare untere Kammern. Als am Ende des Experiments die Flüssigkeiten der unteren Kammern auf Columbia-Blut-Agar-Platten ausgestrichen und bebrütet wurden, zeigte sich ebenfalls kein Wachstum. Die durchschnittlichen Tage der ersten Eintrübung pro Gruppe sind aus Tabelle 3 ersichtlich. Alle

Routineuntersuchungen bezüglich der Vitalität der Bakterien aus den oberen Kammern zeigten Wachstum mit ähnlichen Zählungen während des gesamten Experimentes.

Beginnend mit dem achten Monat zeigte die Gruppe „Ca(OH)₂“ bis Ende des Experimentes signifikant weniger undichte Proben als alle anderen Gruppen (Abb. 24). Außerdem war die Gruppe „LM“ zwischen Monat fünf und acht signifikant undichter als die Gruppe „CHX“.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
			Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2	Ca(OH)_2
			LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM	LM
			CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX
			Kein Med	Kein Med	Kein Med	Kein Med	Kein Med	Kein Med	Kein Med	Kein Med	Kein Med
———— = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$)											
Ca(OH)_2 = Kalziumhydroxid • LM=Ledermix • CHX=Chlorhexidin • Kein Med=Kein Medikament											

Abbildung 24:
Darstellung der Anzahl undichter Proben, aufgetragen nach Gruppen und Monaten

*Tabelle 3:
Übersicht über die Anzahl undichter Proben, sowie durchschnittlicher Eintrübungstag (Median) pro Gruppe*

Material	Undichte Proben/untersuchte Proben	Durchschnittlicher Tag der Eintrübung
CHX	14/19	268
Ledermix	15/20	152
Ca(OH) ₂	6/20	227
kein Medikament	13/20	168

7.4 Diskussion

Staphylococcus epidermidis wurde gewählt, da die Spezies einfach zu kultivieren ist, sich schon in früheren Studien als penetrationsfähiger Organismus erwiesen hat (464, 421) und aus Wurzelkanälen isoliert wurde (163, 122).

In einem Tierexperiment zeigten Tepel et al., dass periapikale Gewebe nach Ledermix-Einlage eine verzögerte Wundheilung aufwiesen (527). Trotzdem wurde Ledermix für dieses Experiment verwendet, da es zum einen häufig in deutschen Zahnarztpraxen verwendet wird und zum anderen einen möglichen Residualeffekt besitzt.

Chlorhexidin hat antimikrobielle Eigenschaften gegen Keime, die aus endodontischen Infektionen stammen (528). White et al., Seichter und van der Schelling und Koskinen et al. konnten zeigen, dass sich mit zunehmender CHX-Konzentration auch die antimikrobielle Wirkung verbessert (243, 198, 237). White et al. untersuchten den Residualeffekt einer 2%igen CHX-Lösung und konnten eine antimikrobielle Wirkung noch 72 Stunden nach Spülung beobachten. Um gegebenenfalls den Residualeffekt noch zu verstärken und um ein Medikament zu verwenden, das die Mehrheit der intrakanalären Bakterien abtötet, wurde in der vorliegenden Studie ein 5%iges CHX-Gel verwendet.

Im Gegensatz zu anderen Studien mit ähnlichem Design erwiesen sich in der

vorliegenden Untersuchung alle Wurzelkanalfüllungen während der ersten drei Monate als dicht. Dies mag mit dem speziellen Vorgehen bei der Sterilisation zusammenhängen. Khayat et al., Barthel et al. und Chailertvanitkul et al. führten die Ethylenoxid-Sterilisation nach Füllung der Wurzeln durch. Dies impliziert einen gewissen Nachteil: Um die Sterilisation korrekt durchführen zu können, muss das Gas bei einer Temperatur von 45° oder 55°C appliziert werden. Auch wenn der Schmelzpunkt von Guttapercha etwas höher liegt (ab 65°C (529)), ist es denkbar, dass diese Temperaturerhöhung bereits die Wurzelkanalfüllungen oder die Wachsversiegelung beeinträchtigt oder zumindest verändert. In der vorliegenden Studie wurden die Wurzeln vor der Füllung sterilisiert. Dies erlaubte ein Füllen unter simulierten klinischen Bedingungen und unter Vermeidung einer anschließenden Temperaturerhöhung.

Interessanterweise zeigte Ca(OH)_2 den längsten inhibitorischen Effekt unter den getesteten Medikamenten. Wie bereits mehrfach erwähnt, hat Ca(OH)_2 aufgrund der starken Pufferkapazität des Dentins (514) eine langsame Diffusionsgeschwindigkeit im Dentin (286). Möglicherweise ist nach Erreichen des erhöhten pH-Wertes die Pufferkapazität des Dentins erschöpft, wodurch für längere Zeit ein alkalisches Milieu geschaffen wird. Dies ist könnte eine Erklärung für den langanhaltenden antimikrobiellen Effekt der Proben der Gruppe „ Ca(OH)_2 “ sein.

Während Siqueira et al. zeigen konnten, dass wurzelkanalgefüllte Zähne unter Verwendung eines Ca(OH)_2 -haltigen Sealers (Sealapex) nach 60 Tagen Beobachtungszeit in 80% der Fälle undicht waren (530), zeigte die Medikation mit frisch angemischtem Ca(OH)_2 in der vorliegenden Studie selbst nach einjähriger Beobachtungszeit nur in 40% der Proben eine Undichtigkeit. Dies mag damit zusammenhängen, dass ein ausgehärteter Sealer nicht mehr imstande ist, viel Hydroxyl-Ionen freizusetzen und damit keine ausreichende Alkalisierung des Dentins stattfinden kann. Gegen Ende der Beobachtungszeit in dieser Studie war die Gruppe „ Ca(OH)_2 “ auch der Gruppe „CHX“ überlegen. Eine einleuchtende Erklärung dafür gibt es nicht, es ist jedoch denkbar, dass das mit Methylzellulose angemischte CHX-Gel vor der Wurzelkanalfüllung nicht völlig rückstandsfrei aus dem Kanal entfernt werden konnte und nach einer gewissen Zeit durch die permanente feuchte

Exposition herausgelöst wurde. Damit könnte nach Erlöschen der CHX-Wirkung den Mikroorganismen der Weg zur Passage freigegeben worden sein. Eine ähnliche Begründung könnte auch das ungünstige Abschneiden der Gruppe „LM“ erklären. Es ist unbekannt, welchen Einfluss die Salbengrundlage der Ledermixpaste auf die Qualität der Wurzelkanalfüllung hat.

Kontakiotis et al. untersuchten die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen nach 15-tägiger Ca(OH)_2 -Einlage mit einem Fluid-Transport-Modell und mit Methylenblau (291). Mit dem Fluid-Transportmodell fanden die Autoren keinen Unterschied bezüglich der Dichtigkeit zwischen mit und ohne Ca(OH)_2 -vorbehandelten Zähnen, während mit der anderen Methodik die Gruppe der Zähne ohne Ca(OH)_2 -Behandlung signifikant mehr Farbstoffpenetration zeigte. Die Autoren führen diese Diskrepanz auf die unterschiedliche Validität der Methodiken zurück. In einer früheren Studie hatte dieselbe Forschergruppe festgestellt, dass sich Methylenblau in Kontakt mit Ca(OH)_2 entfärbt (292), wodurch sich erklären ließe, dass sich in den Ca(OH)_2 -freien Proben deutlich mehr Farbstoff zeigte. Die Studie von Kontakiotis et al. wurde für 14 Wochen durchgeführt und zeigte im Fluid-Transport-Modell keinen Unterschied bezüglich der Dichtigkeit zwischen den mit oder ohne Ca(OH)_2 -vorbehandelten Zähnen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, in der ein signifikanter Unterschied zwischen den Zähnen mit Ca(OH)_2 -Einlage oder ohne medikamentöse Einlage erst ab dem achten Monat auftrat.

CHX zeigte in der vorliegenden Studie zwischen Monat fünf und acht einen signifikant stärkeren antimikrobiellen Effekt als Ledermix. Jung et al. spülten Wurzelkanäle mit CHX, NaOCl und physiologischer Kochsalzlösung, bevor sie die Wurzelkanäle füllten und einem Bakterienpenetrationstest unterzogen (239). Während die mit NaOCl und NaCl behandelten Wurzeln innerhalb von 24 Stunden zu 70 bzw 80% undicht waren, zeigten die CHX-behandelten Proben nach 35 Tagen erst 20% Undichtigkeit, womit sich diese Gruppe signifikant von den beiden anderen unterschied. Die Studie von Jung et al. legt die Vermutung nahe, dass die Substantivität des Chlorhexidin auch nach Obturation der Wurzelkanäle in einer antimikrobiellen Wirkung resultierte. In der vorliegenden Studie konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden, die mit CHX behandelten Proben unterschieden sich

zu keinem Zeitpunkt signifikant von denen, die ohne medikamentöse Einlage geblieben waren. Während Jung et al. CHX als Spüllösung verwendeten, wurde es in dieser Studie als Gel auf Methylzellulose-Basis verwendet. Wie bereits erwähnt, könnte eine unvollständige Entfernung des Gels möglicherweise zu unzureichenden Wurzelkanalfüllungen geführt haben, wodurch der Effekt der Substantivität aufgehoben war. Es wäre daher von Interesse, zu untersuchen, ob die Einlage mit einem Methylzellulose-Gel einen Einfluß auf die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen hat.

7.5 Schlussfolgerungen

Obturierte Wurzeln erwiesen sich nach einjähriger Beobachtungszeit signifikant dichter gegen eine Passage von *Staph. epidermidis*, wenn vor der Wurzelkanalfüllung eine Medikation mit frisch angemischtem Ca(OH)_2 erfolgt war im Gegensatz zu Vorbehandlung mit einem 5%igen CHX-Gel, Ledermix oder ohne Medikament. Eine einwöchige Einlage einer Ca(OH)_2 -Paste kann daher möglicherweise vorbehaltlich der Übertragbarkeit von *In-Vitro*-Ergebnissen auf *In-vivo*-Verhältnisse zu einer verbesserten Bakteriendichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen führen.

Bezüglich der Methodik darf empfohlen werden, die Sterilsation der Proben vor Durchführung der Wurzelkanalfüllungen vorzunehmen, da diese hierdurch möglicherweise bakterieller Penetration wesentlich länger standhalten als bei Sterilisation nach Fertigstellung des experimentellen Aufbaus.

8 Zusammenfassende Diskussion

Soll anhand der Ausgangssituation eines Zahnes vor endodontischer Behandlung eine Prognose für den Erfolg der Behandlung gegeben werden, so kann beobachtet werden, dass Alter, Geschlecht, Gesundheit des Patienten sowie Art des Zahnes keine zuverlässigen Vorhersageparameter darstellen. So fanden zwar Grossman et al. und Oliet und Sorin, dass die Erfolgsprognose bei jüngeren Patienten besser sei als bei älteren (531, 532), Smith et al. stellten jedoch das Gegenteil fest (533). In der zuletzt zitierten Studie fanden die Autoren außerdem, dass die Prognose für Wurzelkanalfüllungen bei männlichen Patienten günstiger sei als bei weiblichen, was wiederum von Swartz et al. widerlegt wurde, bei denen Frauen eine bessere Prognose für den Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung aufwiesen (534). Für diese Unterschiede hatte keiner der Autoren eine Erklärung. Ähnlich kontrovers fielen die Untersuchungen bezüglich Art des Zahnes oder der Lokalisation des Zahnes aus (535-537, 532, 538-542, 534, 543, 544).

Ein deutlich Prognose beeinflussender Umstand ist jedoch der Ausgangszustand des Periapex. Liegt initial keine apikale Parodontitis vor, so ist die Erfolgsquote etwa 10-25% höher als bei Entzündung des Periapex (535, 545-547, 537, 548, 538, 549, 550, 534, 551-554, 544, 555, 556). In einigen Studien sind die Unterschiede der Erfolgsquoten zwischen beiden Ausgangssituationen jedoch auch deutlich geringer, nämlich 1-3% (532, 557, 558, 540-542) oder deutlich größer (28-35%) (531, 559, 560).

Noch klarer wird der Unterschied zwischen Ausgangssituation mit oder ohne apikale Parodontitis bei Betrachtung der Erfolgsquote von Revisionen. Bei Zähnen ohne initiale apikale Parodontitis werden Erfolgsquoten zwischen 89% und 100% angegeben (535, 545, 537, 561, 562, 552). Bei ursprünglichem Vorhandensein einer apikalen Parodontitis liegen die Erfolgsquoten einer Revision hingegen zwischen 56% und 84% (535, 545, 537, 557, 561, 543, 552, 544, 123). Weiterführende Angaben zu Erfolgsquoten von Wurzelkanalbehandlungen können bei Friedman nachgelesen werden (563).

Da eine apikale Parodontitis in der Regel nur bei Präsenz von

Mikroorganismen oder bakteriellen Toxinen entsteht oder besteht, kann aufgrund der o.g. Zahlen vermutet werden, dass der Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung maßgeblich mit der erfolgreichen Elimination von Bakterien in Zusammenhang steht. Eng formuliert besteht also das Ziel einer Wurzelkanalbehandlung allein in der Entfernung oder Abtötung von Mikroorganismen und bakteriellen Endotoxinen (sofern bei Therapiebeginn präsent) und der Verhinderung einer (Re-)Infektion des Wurzelkanalsystemes durch eine Wurzelkanalfüllung mit größtmöglicher Dichtigkeit.

Die Elimination der Mikroorganismen aus dem Wurzelkanalsystem gestaltet sich schwierig, da die Wurzelkanäle multiple Verzweigungen und oftmals laterale Kanäle aufweisen, die Mikroorganismen beherbergen können und durch rein mechanische Maßnahmen nicht erreichbar sind (Abb. 25). So konnte Hess in einer umfangreichen Arbeit an 2790 Zähnen zeigen, dass knapp 30% aller Front- und etwa 50% aller Seitenzähne Ramifikationen aufweisen (564). An diese bereits 1925 veröffentlichte Studie schlossen sich zahlreiche andere Studien an, die die Vielfalt und Variationen akzessorischer und lateraler Kanäle untersuchten (565-574). Barkhordar konnte sogar in 100% der untersuchten Zähnen laterale Kanäle entdecken (575).



Abbildung 25:


Darstellung eines Oberiefremolaren im Furkations- und Wurzelbereich. Es sind multiple kleine Foramina an der Wurzeloberfläche zu erkennen (Pfeile), die auf den Austritt akzessorischer Kanäle hinweisen.

Trotz der Komplexität der Zahnanatomie wird für das therapeutische Konzept eine Lösung angestrebt, die idealerweise ein steriles und endotoxinfreies Wurzelkanalsystem hinterlässt. Sicherlich stellt sich die Frage, ob für den Erfolg einer Behandlung unbedingt ein steriles Wurzelkanalsystem bzw. eine hermetische Wurzelkanalfüllung nötig sind, zumal die in der Literatur genannten relativ hohen Erfolgsquoten vermuten lassen, dass häufig trotz vieler mutmaßlicher Residualbakterien ein klinisch-radiologischer Erfolg erzielt werden kann. Peters et al. untersuchten das Dentin frisch extrahierter Zähne mit apikaler Parodontitis (576). In 62% der Fälle konnten die Autoren in weiter Entfernung vom Wurzelkanallumen bis kurz vor der Dentin-Zement-Grenze Mikroorganismen nachweisen. Es ist fraglich, ob diese Mikroorganismen alle abgetötet werden können, bevor eine Obturation des Wurzelkanales stattfindet. Matsumoto et al. konnten unmittelbar vor Füllung der Wurzelkanäle in 35% der Fälle Mikroorganismen nachweisen (551). Für die Zähne mit positiver Kultur konnte eine Erfolgsquote von 73%, für diejenigen mit negativer von 76% erzielt werden. Heling und Shapira untersuchten von 118 zu füllenden Zähnen 80 auf Präsenz von Bakterien und fanden in 25% der Fälle positive Kulturen. Bei einer Ausgangssituation mit radiologisch diagnostizierter periapikaler

Lyse wurden in 78% der Fälle ohne isolierbare Bakterien Erfolge erzielt, im Gegensatz zu 67% der Fälle, die positive Kulturen aufwiesen. Es wurde von den Autoren nicht angegeben, ob der Unterschied statistisch signifikant war (577). Bender und Seltzer, Seltzer et al. und Storms konnten keinen Unterschied bezüglich des Erfolges nach positiven oder negativen Kulturen feststellen (546-548). Engström et al. fanden jedoch einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Erfolgsquote zwischen Fällen mit positiver oder negativer präobturativer Kultur (69 vs. 83%) (537). Hierbei waren bei einem initial intakten apikalen Parodont 81% der Fälle mit positiver Kultur erfolgreich und 95% der Fälle mit negativer Kultur. Bei initialer apikaler Parodontitis waren 59% (=positiv) und 73% (=negativ) erfolgreich. Dies konnten auch Zeldow und Ingle feststellen (83% Erfolg bei positiver und 94% bei negativer Kultur) (578). Da es sich bei allen bisher zitierten Studien um ältere Arbeiten handelt, könnte moniert werden, dass die Samplingtechnik zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht so ausgereift war wie heute. Eine Studie von Sjögren et al. aus dem Jahre 1997 wurde jedoch mit einer sehr ausgefeilten Samplingtechnik durchgeführt und kam zu dem überzeugenden Ergebnis, dass Wurzelkanäle mit positiver Kultur vor Obturation eine signifikant geringere Erfolgchance haben (68%) als Wurzelkanäle mit negativer Kultur (94%).

Tabelle 4:

Auflistung der Ergebnisse von Studien, die vor Wurzelkanalfüllung den bakteriellen Status ermittelten

	Erfolg (%)					
	Mit apikaler Aufhellung		Bemerkungen	Ohne apikale Aufhellung		
Autor	Positive Kultur	Negative Kultur		Positive Kultur	Negative Kultur	
Appleton (579)	-	-		84% ↔ 94%		Vital+devital
Oliet (580)	59%	83%	Akute+chronische Abszesse	51%	85%	Chron. ulcerat. Pulpitis
Seltzer et al. (546)	73% ↔ 83%		Laterale Kondensation	94%	97%	Laterale Kondensation
	76%	74%	Zentralstifttechnik	91%	93%	Zentralstifttechnik
Zeldow & Ingle (578)	83% ↔ 94%		Devitale Zähne	-	-	
Bender et al. (547)	77%	77%		88%	91%	
Engström et al. (537)	59% ↔ 73%			81% ↔ 95%		
Engström & Lundberg (581)	-	-		65% ↔ 85%		
Oliet & Sorin (532)	80% ↔ 91%			83% ↔ 95%		
Heling & Shapira (577)	67%	78%		80%	82%	
Matsumoto et al. (551)	-	-		73%	76%	Vital+devital
Sjögren et al. (66)	68% ↔ 97%			-	-	
↔ = statistisch signifikanter Unterschied  = vitale und devitale Zähne						

Bei Betrachtung von Tabelle 4 kann festgestellt werden, dass die Erfolgsquoten bei Zähnen mit apikaler Parodontitis bzw. bei devitalen Zähnen in fünf von acht vorliegenden Studien signifikant höher lagen, wenn vor Wurzelkanalfüllung eine negative Kultur vorlag. Bei vitaler Ausgangssituation war in drei von sieben Studien ein signifikanter Unterschied vorhanden. Dies spiegelt den Unterschied der Erfolgsquoten zwischen Zähnen mit bzw. ohne apikale Parodontitis wider. Zwei Studien hatten keine nach apikaler Ausgangssituation getrennte Auflistung angegeben, hiervon fand sich in einer ein signifikanter Unterschied bezüglich der

Erfolgsquoten zwischen Fällen mit präobturator positivem und negativem Kulturergebnis, in der anderen keiner. Es resultierte zwar nicht in allen Studien bei Zähnen mit initialer apikaler Parodontitis ein signifikant günstigeres Ergebnis bei Vorliegen einer negativen Kultur, was möglicherweise an der geringen Fallzahl einiger Studien liegen könnte. Die Erfolgsquote lag jedoch nur in einer Studie (Seltzer et al., Zentralstifttechnik) um 2% höher, wenn präobturator eine positive Kultur vorlag. Es darf daher gesagt werden, dass die Erfolgsquoten von Wurzelkanalbehandlungen größer sind, wenn vor Wurzelkanalfüllung keine Mikroorganismen mehr nachweisbar sind.

Prinzipiell fragt sich jedoch, wie es in Zähnen mit anfänglich vitaler Ausgangssituation zu positiven Kulturen vor Wurzelkanalfüllung kommen kann. Zähne, die als vital bezeichnet werden, müssen bei den groben diagnostischen Verfahren, die den Zahnärzten zur Verfügung stehen, zumindest eine teilweise intakte Kronenpulpa haben. In vitalem Gewebe befinden sich in der Regel keine Bakterien (63), nach Massler höchstens in der sogenannten „nekrobiotischen Zone“ (148). Stobberingh und Eggink untersuchten, aus wie vielen Zähnen nach Trepanation positive Kulturen gewonnen werden konnten (582). Sie konnten in 28% der vitalen Zähne und ebenso in 28% der Zähne ohne apikalen radiologischen Befund Bakterien nachweisen. Für nekrotische Zähne lag die Prozentzahl bei 43%, für Zähne mit radiologischer apikaler Aufhellung bei 51%. Es ist also theoretisch denkbar, dass im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung an ursprünglich sensiblen Zähnen unter aseptischen Bedingungen das gesamte Pulpagewebe und die Mikroorganismen, die bis zur Pulpa vorgedrungen sind, so entfernt werden können, dass keine Keimverschleppung in die apikalen Anteile der Zähne stattfindet. Da es aber bei vitaler (sensibler) Ausgangssituation scheinbar doch zu positiven Kulturen vor Wurzelkanalfüllung kommen kann, lässt sich vermuten, dass nicht die Präsenz von Bakterien an und für sich für den Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung ausschlaggebend ist, sondern deren *Anzahl*. Da bis heute jedoch weder untersucht werden konnte, wie viele Bakterien/Endotoxine nötig sind, um einen entzündlichen Prozess nicht nur in transienter sondern in anhaltender Form hervorzurufen, noch die individuelle Abwehrkonstitution des Wirtes ermittelt werden kann, noch die genaue Anzahl von Mikroorganismen im Wurzelkanal bestimmt oder gesteuert

werden kann, muss immer noch das ideale therapeutische Ziel sein, eine völlige Keimfreiheit zu schaffen.

Als heute gemeinhin übliches endodontisches Behandlungskonzept darf die chemomechanische Aufbereitung mit Unterstützung von NaOCl, die medikamentöse Einlage eines Ca(OH)_2 -Präparates, und die Füllung mit einem Sealer und Guttapercha betrachtet werden. Es stellt sich die Frage, ob eine oder mehrere dieser Komponenten ersetzt oder weggelassen werden können. In Studie 1 dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die biologische Aktivität in Form von $\text{TNF-}\alpha$ Freisetzung aus Monozyten, verursacht durch *Escherichia coli* LPS, mittels Ca(OH)_2 inhibiert werden konnte. Andere Autoren konnten dies auch für andere LPS bezüglich der Interleukin- oder Prostaglandin-Freisetzung aus Monozyten feststellen (506, 502, 504). Obwohl gut untersucht ist, dass bakterielle Endotoxine auch im Rahmen endodontischer Vorgänge zu entzündlichen Vorgängen führen, ist wiederum nicht bekannt, wie viele Lipopolysaccharide dafür nötig sind. Ein Medikament kann zwar in der Lage sein, Bakterien abzutöten, dies bedeutet jedoch nicht, dass die abgetöteten Zellen physisch aus dem Wurzelkanal entfernt wurden. Nach Tötung der Mikroorganismen könnten also theoretisch deren Zellwandbestandteile zurückbleiben, die weiterhin ein entzündliches Geschehen aufrechterhalten. Für diesen Fall ist ein antibakterielles Medikament mit LPS-neutralisierenden Eigenschaften von Vorteil.

Buttler und Haight Ponce konnten zeigen, dass auch NaOCl LPS neutralisiert. Von daher kann spekuliert werden, dass das Neutralisationsvermögen des Ca(OH)_2 nicht zusätzlich nötig sei (188, 189). Es ist jedoch zu bedenken, dass nach mechanischer Aufbereitung unter chemischer Unterstützung durch NaOCl nur etwa 50-60% der Mikroorganismen abgetötet werden (116, 194). Die verbleibenden Bakterien und deren Zellwandbestandteile sollten demnach durch eine zusätzliche Maßnahme eliminiert werden. Hierbei sind zwei Konzepte denkbar, erstens die Applikation eines bakteriziden Medikamentes oder zweitens die Applikation eines bakteriziden Sealers. Die zweite Möglichkeit wurde von Sargenti mit dem von ihm erfundenen N2 favorisiert (583). N2 und ähnliche Produkte, wie Riebler Paste oder Endomethasone enthalten Schwermetalle und bis zu 6,5% Formaldehyd. Sie sind

abzulehnen, da sie das Wirtsgewebe massiv schädigen, weil via Blutstrom eine schnelle Verteilung von Blei und Formaldehyd im gesamten Körper möglich ist und diese Substanzen neurotoxisch sind (584-594, 527). Newton et al. beobachteten nach 6–12 monatiger Liegedauer von RC-2B (=N2 unter anderem Namen), das bei pulpitischem oder nekrotischem Endodont appliziert wurde, Abszessbildung, Osteomyelitis und Zystenbildung (592). Es gibt auch in jüngerer Zeit wieder Ansätze, antibakterielle Sealer herzustellen. Patel et al. kombinierten einen Glasionomerzement mit einem antibakteriellen Agens (Zeolith) und untersuchten, inwieweit dieser Sealer den Problemkeim *E. faecalis* hemmen kann. Die Autoren stellten fest, dass der experimentelle Sealer die Adhäsion von *E. faecalis* erfolgreich zu verhindern vermochte und selbst 84 Tage nach Anmischen noch diese Eigenschaft besaß. In einer Folgestudie verglich die Autorengruppe die Dichtigkeit des neuen Sealers im Bakterienpenetrationstest gegen *E. faecalis* mit derjenigen zweier anderer Sealer und konnte keinen Unterschied feststellen (595). Bei solchen experimentellen Sealern sind nicht nur die gewebetoxischen Eigenschaften *in vivo* am Menschen zu untersuchen, sondern es gilt auch klinische Langzeitstudien abzuwarten, in denen u.a. Auskunft über die Biokompatibilität gewonnen werden kann. Nachdem die Möglichkeit noch nicht gegeben ist, einen bakteriziden Sealer unter der Bedingung der Schonung des Wirtsgewebes einzusetzen, bleibt zur Zeit nur die Bekämpfung von Bakterien mittels der altbewährten Methode der Spülung während der Aufbereitung und einer medikamentösen Einlage.

In Studie 2 der vorliegenden Arbeit wurde die antimikrobielle Effektivität von Ca(OH)_2 und CHX in zwei Darreichungsformen untersucht. Die Guttapercha-Systeme waren nicht so erfolgreich wie die Pasten. Die meisten *In-vitro*-Studien mit Ca(OH)_2 -haltigen Guttaperchastiften konnten zeigen, dass diese der Paste unterlegen waren (306, 303, 304, 308, 240, 596). Hier handelte es sich zumeist um kommerziell erhältliche Guttaperchaspitzen der Firma Roeko. In der vorliegenden Studie wurden andere Ca(OH)_2 -haltige Guttaperchaspitzen der Firma Roeko verwendet bei denen der Ca(OH)_2 -Anteil im Vergleich zu den bisherigen Spitzen erhöht war. Trotzdem konnte kein mit der Paste vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Die bakterizide Wirkung des Ca(OH)_2 wird auf den hohen pH-Wert zurückgeführt. Zum einen scheinen die Guttaperchaspitzen nicht kontinuierlich über längere Zeiträume

Hydroxyl-Ionen freizusetzen, so dass der pH-Wert im Dentin rasch wieder abfallen kann, zum anderen könnte es sein, dass der direkte Kontakt des Ca(OH)_2 zu den Mikroorganismen fehlt, wie er durch die Paste eher wahrscheinlich ist. Aus dieser Sicht sind Anstrengungen zu befürworten, die eine günstigere Benetzung und/oder Dissoziation der Hydroxyl-Ionen von Ca(OH)_2 -Paste bewirken. So konnten Rivera et al. mit Glycerin angemischtes Ca(OH)_2 signifikant besser in Wurzelkanäle einbringen als mit Wasser angemischtes Ca(OH)_2 (597). Simon et al. untersuchten die dissoziativen Eigenschaften von Ca(OH)_2 , wenn es mit Propylenglycol angemischt wird. Die Autoren konnten zeigen, dass das so angemischte Ca(OH)_2 im Vergleich zu mit Wasser, CMCP oder physiologischer Kochsalzlösung angemischtem Ca(OH)_2 günstigere Eigenschaften bezüglich der Dissoziation von Kalzium- und Hydroxyl-Ionen aufwies (598). In einer jüngst veröffentlichten Studie von Safavi und Nakayama überprüften die Autoren den Dissoziationsgrad von Ca(OH)_2 , das mit verschiedenen Wasser/Glycerin- oder Wasser/Propylenglycol-Kombinationen angemischt war, mittels elektrischer Konduktivität (599). Bei einem Anteil von bis zu 20% Propylenglycol oder Glycerin stieg die Konduktivität im Vergleich zur Mischung mit reinem Wasser etwas an. Mit weiter zunehmendem Anteil von Propylenglycol bzw. Glycerin sank sie jedoch und fiel bei reinem Propylenglycol oder Glycerin auf null. Die Autoren schlossen aus ihrer Studie, dass hohe Konzentrationen von Glycerin oder Propylenglycol letztlich zu einem pH-Wert-Abfall führen und damit die Wirksamkeit des Ca(OH)_2 reduzieren könnten. Barbosa et al. setzten der Ca(OH)_2 -Paste 10 oder 20%ige Detergenzien (Tergentol; Lauryl-diethylen-glycol-ether-Natriumsulphat) hinzu und testeten die antimikrobiellen Eigenschaften. Sie exponierten die Mikroorganismen für 30 Minuten und stellten fest, dass mit Wasser angemischtes Ca(OH)_2 in der vorgegebenen Zeit nur vier von elf Spezies abtöten konnte, während die modifizierten Pasten alle elf Spezies abtöteten (301). Die Autoren konnten jedoch keinen Unterschied zwischen der 10 und der 20%igen Detergenz/Wasser/ Ca(OH)_2 -Mischung feststellen, favorisierten aber die 20%ige Lösung aufgrund ihrer günstigeren Benetzungseigenschaften bei einem resultierenden pH von 10,8.

Flahaut et al. konnten zeigen, dass der Problemkeim *E. faecalis* bei einem pH-Wert von bis zu 11,9 überleben kann (600). Mit diesem Wissen ist es

anzustreben, keinerlei Modifikationen an $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Zubereitungen vorzunehmen, die den pH-Wert von ca. 12,5 erniedrigen.

Da in manchen infizierten Wurzelkanälen mit der Präsenz von diversen Enterobakterien zu rechnen ist, scheint es sinnvoll, ein zusätzliches Medikament verfügbar zu haben, das über einen anderen Wirkmechanismus verfügt als den hohen pH-Wert. Hier bietet es sich an, CHX zu applizieren und zwar nicht als Spüllösung, sondern als medikamentöse Einlage. So konnten Komorowski et al. erst nach siebentägiger Einwirkzeit von 0,2%igem CHX eine erfolgreiche Elimination von Mikroorganismen aus bis zu 450µm Dentin-Tiefe beobachten (236). In der vorliegenden Arbeit erwies sich ein 5%iges CHX-Gel, appliziert über eine Woche, als ebenso effektiv wie $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Paste. Es wurden hier jedoch keine Bestimmung der Spezies vorgenommen, so dass keine Aussage getroffen werden kann, ob sich das CHX-Gel im Einsatz gegen *E. faecalis* bewähren würde.

In einem *In-vitro*-Versuch von Lenet et al. applizierten die Autoren für sieben Tage ein 25%iges CHX freisetzendes Polymer, ein 2%iges CHX-Gel, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Paste oder physiologische Kochsalzlösung in einwurzlige extrahierte Rinderzähne (601). Nach Entfernung der Medikamente wurden die Zähne für 21 Tage mit *E. faecalis* inokuliert. Danach wurden aus verschiedenen Dentinschichten Dentinproben entnommen und inkubiert. Alle Proben, die mit Medikamenten beschickt waren, zeigten signifikant weniger bakterielles Wachstum als die mit steriler Kochsalzlösung behandelten Dentinproben. Die Gruppe mit Applikation von CHX-Gel zeigte signifikant weniger Wachstum als die beiden anderen Gruppen mit medikamentöser Exposition. Obwohl in das CHX-freisetzende Polymer eine 25%ige Konzentration an CHX integriert war, zeigte es eine geringere Wirksamkeit als das 2%ige Gel. Der Medikamententräger ähnelt in seiner Form Guttaperchaspitzen. Es muss auch hier spekuliert werden, dass die Benetzung der Kanalwand für die Effektivität des Medikamentes einen starken Einfluss hat. Es könnten jedoch auch Faktoren wie das unterschiedliche Gesamtvolumen oder unterschiedliche Diffusionseigenschaften eine Rolle hierfür spielen. Da in der Studie von Lenet et al. ein 2%iges CHX-Gel verwendet wurde, in der vorliegenden Arbeit jedoch ein 5%iges Gel, kann gemutmaßt werden, dass auch von dem 5%igen Gel eine effektive Wirksamkeit

gegen *E. faecalis* ausgeht.

Podbielski et al. testeten die antimikrobiellen Eigenschaften verschiedener Medikamente, die in Guttaperchaspitzen integriert waren (305). Bei Inkubation mit *S. intermedius*, *P. gingivalis* und *E. faecalis* zeigte die Ca(OH)_2 -Variante die günstigsten Ergebnisse, bei *P. micros* erwiesen sich eine CHX- und eine CHX-Iod-Polyvinylpyrrolidon-Variante am günstigsten. Für *E. faecalis* sank die Zahl der CFU erst nach zwei Wochen von 10^8 auf 10^4 , während *P. gingivalis* nach spätestens vier Tagen durch alle Medikamenten-Varianten von 10^7 auf 0 absank. Hier ist zu erkennen, dass für jede Spezies und jedes Medikament eine individuelle Wachstumskurve vorliegt. Dieser Versuch wurde jedoch nicht im Wurzelkanal durchgeführt, sondern in 500µl Eppendorf-Pipettierröhrchen.

Bleibt noch die Frage zu stellen, ob eine medikamentöse Einlage im Falle eines infizierten Wurzelkanalsystems überhaupt nötig ist. Es ist immerhin denkbar, dass selbst wenn Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem persistieren, eine entsprechend gute Wurzelkanalfüllung diese weitestgehend einschließt und von jeglicher Substratzufuhr abschneidet. Eine pathogene Wirkung sollten sie demnach nicht mehr entfalten können. Das Thema „single versus multi-visit endodontics“ ist nicht nur in den USA ein heiß diskutiertes. Ein Argument der Befürworter der endodontischen Behandlung in einer Sitzung besagt, eine Wurzelkanalbehandlung in einer Sitzung sei

- wirtschaftlicher,
- zeitsparender,
- von geringerer iatrogener Kontaminationsgefahr
- und mit geringeren postoperativen Exazerbationen behaftet (602, 603).

Roane et al. beobachteten nach einer Sitzung signifikant weniger Schmerzen als nach mehreren Sitzungen (602). Es geht aus der Studie jedoch nicht hervor, ob und welche Medikation bei Mehrfach Sitzungen verwendet wurde. Alhashaireh und Alnegrish beobachteten nach einer Sitzung eine signifikant geringere Schmerzinzidenz im Vergleich zu zwei Sitzungen (603). Die Autoren hatten jedoch im Falle der Mehrfach Sitzung zwischen den Sitzungen weder ein Medikament noch eine Papierspitze in die Wurzelkanäle eingelegt. Da jedoch die Keimzahl in bereits

gereinigten Wurzelkanälen nach einigen Tagen ohne medikamentöse Einlage wieder ihr ursprüngliches Niveau erreicht (202, 119), muß davon ausgegangen werden, dass die Wurzelfüllungen in der Studie von Alhashaireh und Alnegrish in stark infiziertem Zustand erfolgten. Oliet, Mulhern et al., Miyasaki et al. und Ørstavik et al. konnten keinen signifikanten Unterschied im postoperativen Auftreten von Schmerzen nach einmaliger oder mehrfacher endodontischer Behandlung feststellen (604-607). Soltanoff und Pekruhn beobachteten sogar signifikant mehr postoperative Schmerzen nach einmaliger endodontischer Behandlung im Gegensatz zu zweimaliger Behandlung (608, 609).

Wenige Studien existieren über die Ausheilung periapikaler Läsionen nach ein- oder zweimaliger endodontischer Behandlung. Soltanoff fand nach einmaliger Behandlung eine Ausheilung in 85%, nach mehrfacher Behandlung in 88% der Fälle (608). Es wurde hier jedoch nicht unterschieden zwischen ursprünglich vitalen (gering infizierten) oder Zähnen mit apikaler Parodontitis (stark infiziert). Außerdem kann der Studie nicht entnommen werden, welche medikamentöse Einlage für die Mehrfachsitzen verwendet wurde. Als unterstützende Spüllösung wurde hier bei der Aufbereitung nicht NaOCl, sondern physiologische Kochsalzlösung eingesetzt. Oliet beobachtete bei Behandlung in einer Sitzung in 88%, bei Behandlung in zwei Sitzungen in 91% der Fälle einen Erfolg und konnte keinen signifikanten Unterschied feststellen (605). Leider wurde auch hier nicht dargestellt, wie zwischen den Mehrfachsitzen mit den aufbereiteten Wurzelkanälen verfahren wurde. Pekruhn untersuchte die Erfolgsquoten von Wurzelkanalbehandlungen nach einer Sitzung (609). Obwohl nur als einmalige Behandlung deklariert, hatte der Autor einige Zähne mit klinischer Symptomatik in einer zusätzlichen Sitzung vor der Wurzelkanalfüllung zur Schmerzbesitzigung geöffnet und medikamentös in unbenannter Weise versorgt. Interessanterweise war die Erfolgsquote für die zweimalig behandelten Zähne signifikant höher. Trope et al. fanden einen Unterschied von 10% (64% vs. 74% Ausheilung nach einer bzw. zwei Sitzungen), dessen statistische Signifikanz nicht benannt wurde (119). Hierzu ist zu bemerken, dass in allen vier Studien der Zeitraum der Nachuntersuchung zwischen sechs Monaten und zwei Jahren lag. Dies scheint ein relativ kurzer Zeitraum zu sein und hat bezüglich der Erfolgsquoten keine endgültige Aussagekraft über die

Notwendigkeit einer einfachen oder mehrfachen endodontischen Behandlung.

Die aussagekräftigste Studie zu diesem Thema ist sicherlich diejenige von Trope et al., zum einen, weil sie die einzige prospektive Studie ist, zum anderen, weil in ihr ein heute gängiges Konzept der Wurzelkanalbehandlung ausgeführt wurde: Aufbereitung mit NaOCl und im Fall von zwei Sitzungen die Einlage von Ca(OH)_2 . Außerdem wurde hier nur die eigentlich relevante Fallgruppe untersucht, Zähne mit apikaler Parodontitis. Für eine fundierte Bewertung der Erfolgsquoten sind jedoch weitere Studien mit einer Laufzeit von mehreren Jahren erforderlich.

Ein bisher wenig berücksichtigter Faktor bei der Erhebung von Daten bezüglich der Erfolgsquoten endodontisch behandelter Zähne ist die Versorgung nach Obturation des Wurzelkanales. Aus Tabelle 5 kann ersehen werden, dass obturierte Wurzeln in relativ kurzer Zeit eine bakterielle Penetration von koronal nach apikal erlauben, wenn keine Deckfüllung appliziert wurde. Der maximale Beobachtungszeitraum der bisherigen Studien war 90 Tage.

Tabelle 5:
Übersicht über in vitro durchgeführte bakterielle Penetrationsversuche

Autor	Gegenstand des Testes	Mikroorganismus	Undicht nach
Torabinejad (464)	Laterale Kondensation	<i>Staph. epidermidis</i> <i>Proteus vulgaris</i>	100% nach 51 Tagen 100% nach 73 Tagen
Khayat (465)	Laterale, vertikale Kondensation	Speichel	100% nach 46 Tagen
Wu (473)	Bakterien, Fluid-Modell	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7% nach 50 Tagen
Chailertvanitkul (478)	Tubliseal, AH26	Stoffwechselprodukte von <i>Fusobacterium nucleatum</i>	100% nach 84 Tagen
Chailertvanitkul (477)	Mit oder ohne Smearlayer	<i>Strep. sanguis</i>	100% nach 86 Tagen
Chailertvanitkul (610)	Tubliseal, Apexit	<i>Strep. sanguis</i> <i>Prevotella intermedia</i>	100% nach 88 Tagen
Chailertvanitkul (611)	Tubliseal, Apexit	Anaerobe <i>Strep.</i> <i>Prevotella intermedia</i>	52% nach 90 Tagen
Malone (612)	Super-EBA, Ketac Endo	Speichel	60% nach 60 Tagen
Alves (463)	Bakterien vs. Endotoxine	<i>Campylobacter rectus</i> <i>Peptostrep. micros</i> <i>Fusobact. nucleatum</i> <i>Prevotella intermedia</i>	67% nach 70 Tagen
Cerutti (480)	Laterale, vertikale Kondensation, System B, Thermafil, Microseal	<i>Strep. mutans</i>	50% nach 30 Tagen
Chailertvanitkul (516)	Retrograde Füllungen mit SuperEBA, Ultraschall oder Präparation mit Fräse	Anaerobe <i>Strep.</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	37% nach 90 Tagen
Pisano (521)	Cavit, IRM, SuperEBA	Speichel	100% der Wurzeln ohne Deckfüllung nach 49 Tagen
Barthel (421)	Roth 801 Sealer, Ketac Endo, AH26	<i>Staph. epidermidis</i>	52% nach 38 Tagen
Barthel (517)	Cavit, IRM, Glasionomerzement, Cavit/Glasionomerzement IRM/Glasionomerzement	<i>Streptococcus mutans</i>	41% nach 30 Tagen
Siqueira (530)	AH26, Sealapex	Speichel	58% nach 59 Tagen
Padachey (595)	ZUT, KT 308, AH26, Nur Sealer, Zentralstifttechnik	<i>Enterococcus faecalis</i>	18% nach 90 Tagen
Timpawat (479)	AH-Plus, Apexit, Ketac-Endo	<i>Enterococcus faecalis</i>	54% nach 60 Tagen

Es ist verwunderlich, dass sich Wurzelkanalfüllungen *in vitro*, durchgeführt von unterschiedlichen Behandlern, nach relativ kurzem Zeitraum als undicht erweisen. Ricucci et al. untersuchten in einer jüngst erschienenen retrospektiven Studie den periapikalen Status wurzelkanalgefüllter Zähne, die durch fehlende Füllungen oder Karies in direktem Kontakt zum Mundmilieu standen (613). Die Autoren konnten im Vergleich zu wurzelkanalgefüllten Zähnen mit intakten

koronalen Restaurationen keinen signifikanten Unterschied feststellen. Sie zogen den Schluss, dass die Übertragbarkeit der *In-vitro*-Penetrationstests auf *In-vivo*-Verhältnisse als fraglich angesehen werden muss. Snider et al. und Soluti konnten jedoch im Tierversuch zeigen, dass Wurzelkanalfüllungen ohne Deckfüllung im Gegensatz zu obturierten Zähnen mit intakten Deckfüllungen zu periapikalen Läsionen führen (483, 484). Soluti beobachtete hierbei histologisch keine Unterschiede bis zum dritten Monat nach Wurzelkanalfüllung. Da Ricucci et al. die genauen Zeiträume während derer die füllungslosen/kariösen Zähne dem oralen Milieu ausgesetzt waren, nicht bestimmen konnten, ist es denkbar, dass in einigen Fällen die Standzeit unter fünf Monaten lag und somit keine radiologischen Zeichen einer apikalen Parodontitis erkennbar waren. Tronstad et al. untersuchten, inwieweit die koronale Versorgung einen Einfluss auf den periapikalen Zustand von 1001 endodontisch behandelten Zähnen haben könnte (614). Die höchste Erfolgsquote von 81% konnte festgestellt werden, wenn sowohl die Wurzelkanalbehandlung als auch die koronale Versorgung radiologisch als „gut“ bezeichnet werden konnten. Bei „guten“ Wurzelkanalfüllungen mit „schlechten“ Restaurationen sank die Erfolgsquote mit statistisch signifikantem Unterschied auf 71%. Bei „schlechten“ Wurzelkanalfüllungen, die „gute“ oder „schlechte“ koronale Füllungen hatten, sank die Erfolgsquote auf 56% bzw. 57%. Aus ihrer Studie geht hervor, dass die koronale Versorgung nur dann einen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf den periapikalen Status hatte, wenn die Wurzelkanalfüllung radiologisch dicht erschien und in einem Abstand von 1–2mm vor dem radiologischen Apex lag. Bei ungenügenden Wurzelkanalfüllungen hatte die Qualität der koronalen Restauration keinen Einfluss. Dies steht im Widerspruch zu der älteren Studie von Ray und Trope, die in einer ähnlichen Untersuchung mit statistischer Signifikanz herausfanden, dass die Qualität der koronalen Versorgung für die Gesundheit der periapikalen Gewebe wichtiger ist als die Qualität der Wurzelkanalfüllung (476). Eine Erklärung für diese Diskrepanz konnte von Tronstad et al. nicht gefunden werden. Adib et al. untersuchten die Mikroflora von wurzelkanalgefüllten Zähnen unmittelbar nach Extraktion (615). Hierbei wurden das koronale und zwei apikale Segmente examiniert. Jede der in einem Wurzelkanal entdeckten Spezies war in allen Segmenten nachweisbar. Die meisten Mikroorganismen waren jedoch im koronalen

Segment zu finden. Dies könnte ein indirekter Nachweis für die koronal-apikale Penetration von Mikroorganismen sein. Es darf formuliert werden, dass an die Qualität aller Barrieren gegen Mikroorganismen von der Mundhöhle zum Periapex höchste Anforderungen gestellt werden müssen, um optimalen Schutz zu gewährleisten.

Sicherlich sind die *In-vitro*-Penetrationstests im Vergleich zu den *In-vivo*-Untersuchungen insofern überzeichnend, als im schlimmsten Falle ein einziges Bakterium die sterile Lösung erreichen, sich dort vermehren kann und die Probe damit als undicht kennzeichnet. Trotzdem können aus solchen Studien relative Erkenntnisse gewonnen werden, indem unterschiedliche Materialien oder Techniken miteinander verglichen werden. Außerdem können hier einige Variablen wie Zahnanatomie, unterschiedliche Materialien und Techniken, differente immunologische Konstitution des Versuchsobjektes u.a. durch Standardisierung ausgeschlossen werden.

Alves et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Passage von Endotoxinen signifikant schneller abläuft als die von Bakterien (463). Nach 38 Tagen konnte eine erste bakterielle Passage von koronal nach apikal beobachtet werden. In der vierten Studie der vorliegenden Arbeit waren alle Proben über drei Monate lang dicht. Auch die Studie von Padachey et al. zeigte eine sehr geringe Anzahl undichter Proben nach 90 Tagen (595). Dies mag damit zusammenhängen, dass die Sterilisation der Proben in den Studien von Alves et al. und Padachey et al., nicht wie in den meisten anderen Studien (u.a. auch Studie 3 dieser Arbeit), nach Wurzelkanalfüllung und Installation des Setups mit Ethylenoxid stattgefunden hat, sondern durch Gamma-Bestrahlung. Wu et al. autoklavierten die Zähne bevor sie unter sterilen Bedingungen gefüllt und in den Versuchsaufbau eingebracht wurden (473). In Studie 4 wurde durch ein Druck-Sterilisationsverfahren und mit Ethylenoxid sterilisiert, jedoch vor Wurzelkanalfüllung und Installation des Versuchsaufbaus. Dies erfordert zwar ein anschließendes Arbeiten unter sterilen Bedingungen, gewährleistet jedoch, dass weder die Guttapercha der Wurzelkanalfüllung noch die Wachs-Abdichtung an den notwendigen Temperaturerhöhungen Schaden nehmen. Es darf daher spekuliert werden, dass im Rahmen der hier dargestellten *In-vitro*-

Studien das Sterilisationsverfahren oder der Zeitpunkt der Sterilisation einen maßgeblichen Einfluss auf den Zeitpunkt der bakteriellen Passage hat.

In Studie 3 der vorliegenden Arbeit wurde die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen mit provisorischen Deckfüllungen untersucht. Safavi et al. untersuchten in einer *In-vivo*-Studie, inwieweit eine verspätete definitive Versorgung einen Einfluss auf die Prognose eines endodontisch behandelten Zahnes hat (616). Es wurden Zähne einbezogen, die entweder provisorisch mit Cavit oder IRM oder mit einer definitiven Restauration versorgt waren. Mehr Erfolge konnten bei definitiv versorgten Zähne verzeichnet werden, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Bei näherer Betrachtung der präsentierten Daten kann jedoch festgestellt werden, dass einige Zähne zu Beginn der endodontischen Behandlung ein intaktes apikales Parodont aufwiesen, bei der Nachuntersuchung jedoch radiologisch eine apikale Aufhellung zeigten. Dies war in 5% der Zähne mit Goldgussfüllung, aber in 14% der provisorisch versorgten Zähne der Fall. Leider gehen die Autoren darauf nicht näher ein, es ist auch nicht erkennbar, ob hier ein statistisch signifikanter Unterschied vorlag.

Drei Studien der vorliegenden Arbeit beschäftigten sich mit der Effektivität von medikamentösen Einlagen. Die hervorragenden Eigenschaften von Ca(OH)_2 konnten in allen drei Studien dargestellt bzw. bestätigt werden. Auch CHX kann als geeignetes Medikament gesehen werden, die Applikation sollte jedoch in Gelform erfolgen. Obwohl keine harten Daten darüber vorliegen, ob eine medikamentöse Einlage im Falle eines infizierten Wurzelkanals als zwingend notwendig betrachtet werden muss, kann eine Tendenz beobachtet werden, die dieses Vorgehen empfehlenswert erscheinen lässt. Viele Studien, die die Erfolgsquoten bei negativer oder positiver bakterieller Kultur vor Obturation untersuchten, konnten signifikant höhere Erfolgsquoten bei negativer Kultur feststellen (Tab.4). Die medikamentöse Einlage von beispielsweise Ca(OH)_2 führt in jedem Falle zu einer Keimreduktion, in vielen Fällen sogar zu einem keimfreien Zustand. Weshalb sollte im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung darauf spekuliert werden, dass die nach Aufbereitung noch vorhandenen Mikroorganismen durch die Wurzelkanalfüllung so „einzementiert“ werden, dass sie nicht zu einer apikalen Entzündungsreaktion beitragen können, wo

die Kenntnis vorliegt, dass diese Keime durch eine mindestens einwöchige medikamentöse Einlage weitgehend reduziert werden können?

Zwei Studien dieser Arbeit beschäftigten sich mit der Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen gegen bakterielle Penetration. Obwohl die Relevanz solcher Studien direkt oder indirekt von manchen Autoren in Frage gestellt wurde (616, 613), zeigte es sich im Tierexperiment, dass Wurzelkanalfüllungen ohne Deckfüllungen nach bestimmten Zeitintervallen zu periapikalen Läsionen führen (483, 484). Der Zeitpunkt der Auswirkungen der Undichtigkeit ist jedoch später anzusiedeln als bei den meisten *In-vitro*-Tests. Eine Ca(OH)_2 -Einlage vor Obturation und eine baldmögliche Deckfüllung mit möglichst adhäsiv eingesetzten Füllungsmaterialien konnten in den vorliegenden Studien die Dichtigkeit prolongieren. Es darf daher spekuliert werden, dass diese Maßnahmen auch *in vivo* zu einer längeren Bakteriendichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen führen könnten.

9 Schlussfolgerungen

In Beantwortung der in der Zielstellung dieser Arbeit gestellten Fragen können folgende Empfehlungen gegeben werden:

1.) Im Falle einer Wurzelkanalbehandlung eines Zahnes mit infiziertem Endodont sollte nicht auf die medikamentöse Einlage mit Ca(OH)_2 verzichtet werden. Eine mindestens einwöchige Applikation von Ca(OH)_2 kann

- bakterielle Endotoxine neutralisieren,
- die Zahl der Mikroorganismen im Wurzelkanal signifikant reduzieren und
- eine Re-Infektion des nachfolgend obturierten Wurzelkanals erheblich hinauszögern.

2.) Chlorhexidin kann, appliziert als 5%iges Gel, eine effektive Keimelimination im Wurzelkanalsystem bewirken. Eine Re-Infektion des obturierten Wurzelkanalsystems wird dadurch jedoch nicht verzögert. Bisher sind auch in der Literatur keine Angaben zu finden, die einen LPS-neutralisierenden oder einen Gewebe auflösenden Effekt für Chlorhexidin nachweisen konnten.

3.) Die *In-situ*-Applikation von Ca(OH)_2 als Paste sowie die Applikation eines 5%igen Chlorhexidin-Gels sind der Applikation in anderer Darreichungsform, nämlich integriert in Guttaperchastifte, überlegen.

4.) Die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen kann durch Applikation provisorischer Füllungsmaterialien über mehrere Monate nicht ausreichend gewährleistet werden. Adhäsiv gelegte Aufbaumaterialien verbessern die Protektion, ein Langzeit-Schutz wird jedoch nicht erzielt. Es muss daher nach wie vor empfohlen werden, nicht länger als drei Monate mit der definitiven Versorgung eines wurzelkanalbehandelten Zahnes zu warten.

10 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Studien vorgestellt, die sich mit der Notwendigkeit und Art medikamentöser Einlagen zur Reduktion von Mikroorganismen im Wurzelkanal im Rahmen von Wurzelkanalbehandlungen beschäftigten. In **Studie 1** wurde untersucht, inwieweit Kalziumhydroxid in der Lage ist, bakterielle Endotoxine zu neutralisieren. Hierzu wurden zunächst menschliche Monozyten gewonnen. Die Ausschüttung des Zytokins TNF- α aus Monozyten kann bei deren Kontakt mit bakteriellen Endotoxinen als Maß für die biologische Aktivität der Endotoxine betrachtet werden. *Escherichia coli* LPS wurden in unterschiedlichen, jedoch endodontisch relevanten Konzentrationen mit pyrogenfreiem Wasser vermischt und zweifach angesetzt. In je eine der fertiggestellten Proben wurde gesättigte Ca(OH)₂-Lösung gegeben, die andere wurde ohne Medikament belassen. Die gewonnenen Monozyten wurden mit den Lösungen konfrontiert. Nach vierstündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und auf den Gehalt an TNF- α untersucht. Die mit Ca(OH)₂ vorbehandelten LPS zeigten ähnlich niedrige TNF- α -Ausschüttungen wie die Kontrollgruppen, die keinerlei LPS enthielten. Im Gegensatz dazu zeigten LPS, die ohne Ca(OH)₂-Vorbehandlung appliziert worden waren, hoch signifikant höhere TNF- α -Werte. Aus der Studie konnte geschlossen werden, dass zumindest für *E. coli* LPS von einer Neutralisierung durch Ca(OH)₂ ausgegangen werden kann.

In **Studie 2** sollte die Effektivität von Ca(OH)₂ und Chlorhexidin (CHX) bezüglich ihrer keimreduzierenden Eigenschaften untersucht werden. Hierbei wurden die Wurzeln extrahierter menschlicher Zähne sterilisiert und in Prothesen einpolymerisiert. Die Prothesen wurden von zwei Freiwilligen jeweils für eine Woche getragen, so dass eine Besiedlung der Wurzelkanäle durch orale Mikroorganismen stattfinden konnte. Nach initialer Bestimmung der Keimzahl in jedem Wurzelkanal wurden für eine Woche unterschiedliche Medikamente appliziert: gesättigtes Ca(OH)₂ als Paste oder zu ca. 52% im Guttaperchastift, CHX als 5%iges Gel oder zu 5% im Guttaperchastift. Danach fand eine erneute Bestimmung der Keimzahlen statt. Die Wurzeln wurden anschließend ohne Medikament für eine weitere Woche inkubiert und im Anschluss auf bakterielle Besiedlung untersucht. Sowohl die

Ca(OH)₂-Paste als auch das CHX-Gel waren in der Lage, die Keimzahl so zu reduzieren, dass nach der ersten Woche in 86% bzw. 71% der Fälle keine Bakterien mehr isoliert werden konnten. Nach der zweiten Woche waren in beiden Gruppen immerhin noch 64% ohne nachweisbare Bakterien. Die Guttaperchasysteme schnitten hierbei signifikant schlechter ab.

In **Studie 3** wurde die Re-Infektion des Wurzelkanals nach Wurzelkanalfüllung untersucht. Hierbei wurden adhäsive (Clearfil, CoreRestore) und provisorische Füllungsmaterialien (Ketac-Fil, IRM) als Deckfüllungen appliziert und die bakterielle Passage über einen Zeitraum von einem Jahr bestimmt. Die lateral kondensierten und mit Deckfüllung versorgten Wurzeln wurden zwischen zwei Kammern platziert, von denen die obere eine Bouillon mit *Staphylococcus epidermidis* in einer Konzentration von 10⁸ CFU/ml enthielt und die untere eine sterile klare Bouillon. Eine Eintrübung der unteren Kammer war ein Anzeichen für bakterielles Wachstum und damit für die Undichtigkeit des zwischengeschalteten Zahnes. Nach einem Jahr zeigten alle Gruppen eine ähnliche Anzahl undichter Proben. Bis Monat 10 zeigte die Gruppe der mit Clearfil versorgten Wurzeln für mehrere Monate signifikant weniger undichte Proben als die Gruppen, deren Zähne mit IRM oder Glasionomerzement versorgt waren. Die stärkste Zunahme an undichten Proben konnte in den ersten vier Monaten beobachtet werden. Es konnte die Schlußfolgerung gezogen werden, dass wurzelkanalgefüllte Zähne eine baldmögliche definitive Versorgung erhalten sollten, idealerweise innerhalb der ersten drei Monate nach Füllung.

In **Studie 4** wurde die Re-Infektion gefüllter Wurzelkanäle nach vorheriger medikamentöser Einlage mit Ca(OH)₂, Chlorhexidin (CHX) oder Ledermix (LM) ermittelt. Hierbei wurden in sterilisierte Wurzeln für eine Woche die oben genannten oder kein Medikament (Kontrolle) eingelegt, bevor sie durch laterale Kondensation obturiert wurden. Danach wurden sie wie in Studie 3 zwischen zwei Kammern platziert, von denen die obere ein bakterielles Inokulum, die untere eine sterile Bouillon enthielten. Beginnend mit dem achten Monat zeigten die mit Ca(OH)₂ behandelten Zähne bis Ende des Experimentes nach 12 Monaten signifikant weniger undichte Proben als die Zähne aller anderen Gruppen. Zwischen Monat fünf und

acht war die Gruppe der Wurzeln mit Ledermixapplikation signifikant undichter als die Gruppen der Wurzeln mit CHX- oder Ca(OH)_2 -Applikation.

In dieser Studie konnte auch beobachtet werden, dass die Wurzeln sehr viel länger dicht waren als in bisherigen Studien. Es wird vermutet, dass das im Vergleich zu den anderen Studien veränderte (vorgezogene) Sterilisationsverfahren der Zähne zu einer prolongierten Dichtigkeit führte.

Unter Berücksichtigung aller vorgestellten Studien darf hier die Empfehlung ausgesprochen werden, im Falle einer Wurzelkanalbehandlung eines infizierten Zahnes eine mindestens einwöchige medikamentöse Einlage mit Ca(OH)_2 vorzunehmen, da hierdurch bakterielle Endotoxine neutralisiert werden, die Zahl der Mikroorganismen im Wurzelkanal signifikant reduziert und ein prolongierter Schutz vor einer Re-Infektion des nachfolgend obturierten Wurzelkanals erreicht wird. Nach erfolgter Wurzelkanalfüllung sollte schnellstmöglich eine dichte, möglichst adhäsiv befestigte provisorische oder eine definitive Deckfüllung appliziert werden, um zusätzlichen Schutz vor einer Re-Infektion des Wurzelkanalsystems zu gewährleisten.

11 Summary

This work presents four studies dealing with endodontic treatment and microorganisms or microbial cell wall components, respectively.

11.1 Summary of study 1

Lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of Gram negative anaerobic bacteria, has been implicated in the pathogenesis of periapical disease resulting from infected root canals. Calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) has been shown to be an effective medicament in such infections, reducing the microbial titre within the canal. It has been proposed that the therapeutic effect of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ may also be the result of direct inactivation of LPS. The aim of this study was to investigate whether the toxic potential of an *E. coli* LPS could be reduced or eliminated by $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Four concentrations of *E. coli* LPS ranging from 1-1000 ng/ml sterile water were incubated in duplicate either with 25 mg of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or sterile water alone. Controls consisted of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ without LPS or sterile water only. Monocytes were collected from peripheral blood by centrifuging through a gradient and plated to a specific density. Adherent monocytes were incubated for four days at 37°C with 5% CO_2 in M199 medium with 10% autologous serum. The different LPS solutions were added to the wells. After four hours the supernatants were collected and quantitatively assayed for $\text{TNF-}\alpha$ using a commercial ELISA kit. Statistical analysis was performed with ANOVA. Results indicated that $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is able to eliminate the ability of an *E. coli* LPS to stimulate $\text{TNF-}\alpha$ production in peripheral blood monocytes ($p < 0.001$).

11.2 Summary of study 2

The aim of this study was to determine the antibacterial effectiveness of either chlorhexidine or calcium hydroxide integrated in gutta-percha points or chlorhexidine or calcium hydroxide delivered as gel or paste, respectively. A total of 70 initially sterile roots with open accesses were carried for one week in the oral cavities of two volunteers. The roots were then removed, samples were taken from the root canals to determine the microorganisms. The roots were medicated with either calcium hydroxide paste, a 5% chlorhexidine gel, a chlorhexidine or a calcium

hydroxide containing gutta-percha point, respectively. The accesses were closed with bonding material and the roots incubated for one week. After removal of the antimicrobial agents, roots were again checked for bacterial growth. One thioglycollate soaked paperpoint was then introduced into each canal, roots were incubated for one more week to observe bacterial re-growth. After one week of medication, the absolute bacterial count revealed significantly less bacteria in all test groups compared to the control samples. However, after one and two weeks the application of chlorhexidine-gel and calcium hydroxide paste resulted in significantly more samples without any microbial colonization as compared to gutta-percha point groups and controls.

11.3 Summary of study 3

The aim of this study was to examine whether obturated roots combined with several adhesive and temporary filling materials can be bypassed by bacteria. Standardized cavities were coronally prepared into 130 straight roots mimicing clinical access cavities. After obturation, the roots were assigned to six test and three control groups and coronally sealed with either Clearfil, CoreRestore, IRM, Ketac-Fil or a combination of IRM/wax or Ketac Fil/wax. The roots were then fixed between a top and a bottom chamber each. The top chamber contained soy broth with 10^8 *S. epidermidis* CFU/ml, the bottom chamber contained sterile soy broth. For one year, the mounts were checked on a regular basis for turbidity in their bottom chambers indicating bacterial growth. After one year, only 3 out of 19 tested samples from the CoreRestore group and 2 out of 20 samples from the Clearfil group resisted leakage. At termination, there was no significant difference in number of leaking samples among the groups. At the beginning of the experiment, IRM performed worst. Between month 5 and 10, Clearfil showed the least leaking samples, for some months this was statistically significant compared to IRM or Ketac-Fil.

11.4 Summary of study 4

The aim of this study was to examine whether intracanal medication prior to root canal obturation has an inhibitory effect on corono-apical penetration of bacteria. 93 single rooted teeth were instrumented and sterilized with ethylene

oxide. They were assigned to three control groups and four test groups. For one week, the roots were dressed with different medicaments: the first group received a 5% chlorhexidine gel, the second was dressed with Ledermix, the third with a fresh mix of calcium hydroxide and water and the fourth group was left unmedicated. After obturation (lateral condensation and AH 26), the roots were fixed between a top and a bottom chamber. The top chamber contained 3ml trypticase soy broth with 10^8 *S. epidermidis* CFU's/ml, whereas the bottom chamber contained sterile trypticase soy broth. For one year, the mounts were incubated at 37°C. They were checked on a regular basis for turbidity in their bottom chambers indicating bacterial growth. None of the test samples leaked for three month. After one year, the calcium hydroxide group had only six leaking out of 20 tested samples whereas the chlorhexidine group had 14 out of 19, the Ledermix group 15 out of 20, and the unmedicated group had 13 leaking samples out of 20 tested. The difference between the calcium hydroxide an the other groups was statistically significant. Ledermix did not perform better than no pre-medication. Chlorhexidine was superior to Ledermix in the second third of the observation period. It may be concluded that under the conditions of this study, calcium hydroxide is considered the medicament of choice to avoid bacterial penetration of the root canal after obturation. The method of sterilizing the teeth prior to integration into the bacterial setup seems to result in prolonged tightness against bacterial penetration.

Reconsidering the results of all four studies it may be recommended to perform multi-visit treatment in case of an infected root canal. A one week intermediate dressing with calcium hydroxide will not only neutralize bacterial LPS, but also reduce bacteria significantly and provide prolonged protection against bacterial penetration after root canal filling. After obturation of the root canal system, it is recommended to quickly provide the tooth with a tight adhesively inserted temporary filling or a definitive restoration to achieve additional protection against bacterial ingress.

12 Literatur

1. Bishop MA, Malhotra M. An investigation of lymphatic vessels in the feline dental pulp. *Am J Anat* 1990; 187: 247-53.
2. Kramer IRH. The vascular architecture of the human dental pulp. *Archs Oral Biol* 1960; 3: 177-89.
3. Tønder K. Vascular reactions in the dental pulp during inflammation. *Acta Odontol Scand* 1983; 41: 247-56.
4. Heyeraas KJ. Pulpal hemodynamics and interstitial fluid pressure: balance of transmicrovascular fluid transport. *J Endod* 1989; 15: 468-72.
5. Fazekas A, Gyorfi A, Irmes F, Rosivall L. Effect of substance P administration on vascular permeability in the rat dental pulp and submandibular gland. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 1: 481-6.
6. Heyeraas KJ, Kvinnsland I. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 1: 393-401.
7. Heyeraas Tønder KJ, Kvinnsland I, Byers MR, Jacobsen EB. Nerve fibres immunoreactive to protein gene product 9.5; calcitonin gene-related peptide, substance P, and ligament, and gingiva in cats. *Acta Odontol Scand* 1993; 51: 207-221.
8. Byers MR. Effects of inflammation on dental sensory nerves and vice versa. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 1: 499-506.
9. Byers MR, Swift ML, Wheeler EF. Reactions of sensory nerves to dental restorative procedures. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 1: 73-82.
10. Olgart L, Kerezoudis NP. Nerve-pulp interactions. *Archs Oral Biol* 1994; 39, Suppl: 47S-54S.
11. Stanley HR. Human pulp response to restorative procedures. Storter Printing, Gainesville 1981.
12. Mjör IA. Microradiography of human coronal dentine. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 225-234.
13. Langeland K. Erkrankungen der Pulpa und des Periapex. In: Guldener PHA, Langeland K, Herausgeber. *Endodontologie*. Thieme, Stuttgart 1993: 39-92.
14. Simon JHS, Walton RE, Pashley DH, Dowden WE, Bakland LK. Pulpal Pathology. In: Ingle JI, Bakland LK, Herausgeber. *Endodontics*. Williams & Wilkins, Baltimore 1994: 419-38.
15. Pashley DH, Walton RE. Histology and physiology of the dental pulp. In: Ingle JI, Bakland LK, Herausgeber. *Endodontics*. Williams & Wilkins, Baltimore 1994: 320-354.

16. Mjör IA, Heyeraas KJ. Pulp-dentin and periodontal anatomy and physiology. In: Ørstavik D, Pitt Ford T, Herausgeber. *Essential Endodontology*. Blackwell Science, Oxford 1998: 9-41.
17. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-9.
18. Cvek M. A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod* 1978; 4: 232-7.
19. Cvek M, Lundberg M. Histological appearance of pulps after exposure by a crown fracture, partial pulpotomy, and clinical diagnosis of healing. *J Endod* 1983; 9: 8-11.
20. Cox CF, Bergenholtz G, Heys DR, Syed SA, Fitzgerald M, Heys RJ. Pulp capping of dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 year observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol* 1985; 14: 156-68.
21. Cox CF. Biocompatibility of dental materials in the absence of bacterial infection. *Oper Dent* 1987; 12: 146-52.
22. Cox CF, Keall CL, Keall HJ, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent* 1987; 57: 1-8.
23. Cox CF. Microleakage related to restorative procedures. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 1: 83-93.
24. Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 1975; 83: 153-8.
25. Bergenholtz G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 122-9.
26. Bergenholtz G, Ahlstedt S, Lindhe J. Experimental pulpitis in immunized monkeys. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 396-406.
27. Bergenholtz G, Warfvinge J. Migration of leukocytes in dental pulp in response to plaque bacteria. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 354-62.
28. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res* 1987; 66: 1149-53.
29. Jontell M, Bergenholtz G, Scheynius A, Ambrose W. Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. *J Dent Res* 1988; 67: 1263-6.
30. Pulver WH, Taubman MA, Smith DJ. Immune components in human dental lesions. *Arch Oral Biol* 1978; 23: 435-443.
31. Hahn CL, Falkler WA, Jr., Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 1989; 15: 20-6.

-
32. Speer ML, Madonia JV, Heuer MA. Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp. *J Endod* 1977; 3: 418-23.
 33. Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M. Class II antigen expressing cells in experimentally induced pulpitis. *Int Endod J* 1991; 24: 8-14.
 34. Nair RPN. Pathology of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, Herausgeber. *Essential Endodontology*. Blackwell Science, Oxford 1998: 68-105.
 35. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996; 81: 93-102.
 36. Trowbridge HO. The blood leucocytes. In: Trowbridge H, Emling R, Herausgeber. *Inflammation: a review of the process*. Quintessence Publishing, Chicago 1989: 39-62.
 37. McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland LK. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *J Endod* 1991; 17: 97-100.
 38. Marroquin BB, Willershausen-Zönnchen B, Pistorius AM, Göller M. Zuverlässigkeit apikaler Röntgenaufnahmen bei der Diagnostik von Unterkiefer-Knochenläsionen. *Schweiz Monatsschr Zahnheilk* 1995; 105: 1142-8.
 39. Sonnabend E, Chan Sook OH. Zur Frage des Epithels im apikalen Granulationsgewebe (Granulom) menschlicher Zähne. *Dtsch Zahnärztl Z* 1966; 21: 627-43.
 40. Nair PNR, Schroeder HE. Epithelial attachment at diseased human tooth-apex. *J Periodontol Res* 1985; 20: 293-300.
 41. Cymerman JJ, Cymerman DH, Walters J, Nevins AJ. Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. *J Endod* 1984; 10: 9-11.
 42. Nilsen R, Johannessen AC, Skaug N, Matre R. In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 58: 160-5.
 43. Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* 1985; 11: 122-5.
 44. Kopp W, Schwarting R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J Endod* 1989; 15: 72-5.
 45. Lukic A, Arsenijevic N, Vujanic G, Ramic Z. Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod* 1990; 16: 119-22.
 46. Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P. Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod* 1991; 17: 26-9.

47. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of Interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 334-6.
48. Marton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J* 1993; 26: 131-6.
49. Seltzer S, Bender IB, Smith J, Freedman J, Nazimov H. Endodontic failures - an analysis based on clinical, roentgenographic, and histologic findings. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967; 23: 500-16.
50. Priebe WA, Lazansky JP, Wuehrmann AH. The value of the roentgenographic film in the differential diagnosis of periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1954; 23: 979-983.
51. Baumann L, Rossman SE. Clinical, roentgenologic and histopathologic findings in teeth with apical radiolucent areas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1956; 9: 1330-6.
52. Wais FT. Significance of findings following biopsy and histologic study of 100 periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1958; 11: 650-3.
53. Linenberg WB, Waldron CA, DeLaune GF. A clinical, roentgenographic, and histopathologic evaluation of periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1964; 17: 467-72.
54. Patterson SS, Shafer WG, Healey HJ. Periapical lesions associated with endodontically treated teeth. *J Am Dent Assoc* 1964; 68: 191-4.
55. Bhaskar SN. Periapical lesions-types, incidence and clinical features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 21: 657-61.
56. Seltzer S, Bender IB, Smith J, Freedman J, Nazimov H. Endodontic failures - an analysis based on clinical, roentgenographic, and histologic findings. II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967; 23: 517-30.
57. Lalonde ER, Luebke RG. An evaluation of 800 specimens. The frequency and distribution of periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25: 861-8.
58. Mortensen H, Winther JE, Birn H. Periapical granulomas and cysts. An investigation of 1600 cases. *Scand J Dent Res* 1970; 78: 241-50.
59. Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42: 656-78.
60. Simon JH. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. *J Endod* 1980; 6: 845-8.
61. Stockdale CR, Chandler NP. The nature of the periapical lesion. *J Dent* 1988; 16: 123-9.

-
62. Spatafore CM, Griffin JA, Jr., Keyes GG, Wearden S, Skidmore AE. Periapical biopsy report: An analysis of over a 10-year period. *J Endod* 1990; 16: 239-41.
 63. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 603-11.
 64. Nobuhara WK, del Rio CE. Incidence of periradicular pathoses in endodontic treatment failures. *J Endod* 1993; 19: 315-8.
 65. Lalonde ER. A new rationale for the management of periapical granulomas and cysts. An evaluation of histopathological and radiographic findings. *J Am Dent Assoc* 1970; 80: 1056-9.
 66. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 297-306.
 67. Simon JHS. Periapical Pathology. In: Cohen S, Burns RC, Herausgeber. *Pathways of the pulp*. Mosby, St. Louis 1994: 337-62.
 68. Hedin M, Polhagen L. Follow-up study of periradicular bone condensation. *Scand J Dent Res* 1971; 79: 436-40.
 69. Ørstavik D. Radiology of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, Herausgeber. *Essential Endodontology*. Blackwell Science, Oxford 1998: 131-56.
 70. Maixner D, Green TL, Walton RE, Leider A. Histological examination of condensing osteitis. *J Endod* 1992; 18: 196 (Abstr. 37).
 71. Torabinejad M, Walton RE. Periradicular lesions. In: Ingle JI, Bakland LK, Herausgeber. *Endodontics*. Williams & Wilkins, Baltimore 1994: 439-64.
 72. Goldman M, Pearson AH. A preliminary investigation of the 'hollow tube' theory in endodontics: studies with neo-tetrazolium. *J Oral Therap Pharmacol* 1965; 1: 618-26.
 73. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 21: 379-87.
 74. Makkes PC. Responses of the living organism to dead and fixed dead enclosed tissue. Dissertation. University of Amsterdam, Amsterdam 1977.
 75. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic pulps. Dissertation. University of Umeå, Umeå 1976.
 76. Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence of periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-84.
 77. Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odont Revy* 1974; 25: 347-58.

-
78. Klevant FJ, Eggink CO. The effect of canal preparation on periapical disease. *Int Endod J* 1983; 16: 68-75.
 79. Szajkis S, Tagger M. Periapical healing in spite of incomplete root canal debridement and filling. *J Endod* 1983; 9: 203-9.
 80. Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod* 1999; 25: 364-8.
 81. Andreasen JO, Andreasen FM. Root resorption following traumatic dental injuries. *Proc Finn Dent Soc* 1991; 88: 96-114.
 82. Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12: 289-93.
 83. Stenvik A, Iversen J, Mjör IA. Tissue pressure and histology of normal and inflamed tooth pulps in Macaque monkeys. *Arch Oral Biol* 1972; 17: 1501-11.
 84. Tønder KJ, Kvinnsland I. Micropuncture measurements of interstitial fluid pressure in normal and inflamed dental pulp in cats. *J Endod* 1983; 9: 105-9.
 85. Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod* 1995; 21: 70-3.
 86. Kapsimalis P, Garrington GE. Actinomycosis of the periapical tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 26: 374-80.
 87. Oppenheimer S, Miller GS, Knopf K, Blechman H. Periapical actinomycosis. An unusual case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46: 101-6.
 88. Happonen RP, Viander M, Pelliniemi L, Aitasalo K. *Actinomyces israelii* in osteoradionecrosis of the jaws. Histopathologic and immunocytochemical study of five cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 580-8.
 89. Nair PNR, Schroeder HU. Periapical actinomycosis. *J Endod* 1984; 10: 567-70.
 90. Happonen RP. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. *Endod Dent Traumatol* 1986; 2: 205-9.
 91. Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* 1988; 21: 277-82.
 92. Robinson HBG, Boling LR. The anachoretic effect in pulpitis. I. Bacteriologic studies. *J Am Dent Assoc* 1941; 28: 268-82.
 93. Burke GW, Knighton HT. The localization of microorganisms in inflamed dental pulps of rats following bacteremia. *J Dent Res* 1960; 39: 205-14.
 94. Gier RE, Mitchell DF. Anachoretic effect of pulpitis. *J Dent Res* 1968; 47: 564-70.

-
95. Allard U, Nord CE, Sjöberg L, Strömberg T. Experimental infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacteroides fragilis* in the jaws of dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1979; 48: 454-62.
 96. Delivanis PD, Fan VS. The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and overinstrumented canals. *J Endod* 1984; 10: 521-4.
 97. Simon JH, Chimenti RA, Mintz GA. Clinical significance of the pulse granuloma. *J Endod* 1982; 8: 116-9.
 98. White E. Paper point in mental foramen. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25: 630-2.
 99. Koppang HS, Koppang R, Solheim T, Aarnes H, Stolen SO. Identification of cellulose fibers in oral biopsies. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 165-73.
 100. Koppang HS, Koppang R, Solheim T, Aarnes H, Stolen SO. Cellulose fibers from endodontic paper points as an etiological factor in postendodontic periapical granulomas and cysts. *J Endod* 1989; 15: 369-72.
 101. Sedgley CM, Messer H. Long-term retention of a paper point in the periapical tissues: a case report. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 120-3.
 102. Sirén EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30: 91-5.
 103. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 200-6.
 104. Weiger R, Manncke B, Werner H, Lost C. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 15-9.
 105. Sundqvist G. Endodontische Mikrobiologie. In: Guldener PHA, Langeland K, Herausgeber. *Endodontologie*. Thieme, Stuttgart 1983: 93-118.
 106. Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. *J Periodontol Res* 1987; 22: 335-41.
 107. Ando N, Hoshino F. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endod J* 1990; 23: 20-7.
 108. McDonald JB, Hare GC, Wood AWS. The bacteriologic status of the pulp chambers in intact teeth found to be nonvital following trauma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1957; 10: 318-22.
 109. Brown LR, Rudolph CE. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1957; 10: 1094-9.
 110. Chirnside IM. A bacteriological study of traumatised teeth. *N Z Dent J* 1957; 53: 176-191.

111. Engström B, Frostell G. Bacteriological studies of the non-vital pulp in cases with intact pulp cavities. *Acta Odontol Scand* 1961; 19: 23-39.
112. Möller A. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 1966; 74: 1-380 (Spec. Iss).
113. Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 91-6.
114. Wittgow WC, Sabiston CB. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod* 1975; 1: 168-71.
115. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 321-9.
116. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 307-12.
117. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15: 18-19.
118. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 318-22.
119. Trope M, Delano EO, Ørstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod* 1999; 25: 345-50.
120. Baumgartner JC, Falkler WA, Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17: 380-3.
121. Byström A, Happonen RP, Sjögren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 58-63.
122. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
123. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 86-93.
124. Hancock H, Sigurdsson A, Trope M. Microbiological analysis of obturated teeth with persistent periapical lesions. *J Endod* 2000; 26: 565 (Abstr. PR 53).
125. Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 133-44.
126. Gell GC, Arnold R, Metzger Z. Pathologic outcome of coinfection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *J Endod* 1998; 24: 297, Abstr. PR 29.

-
127. Nakano-Hasegawa M, Yammazaki S, Kaned Y, Takizawa H, Maeda N, Nakamura J. The formation of biofilms by microorganisms isolated from infected root canals. J Endod 1999; 25: 299, Abstr. PR5.
 128. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod 1992; 18: 427-30.
 129. Van Winkelhoff AJ, Kippuw N, De Graaff J. Cross-inhibition between black-pigmented *Bacteroides* species. J Dent Res 1987; 66: 1663-7.
 130. Sobrinho AP, Barros MH, Nicoli JR et al. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. J Endod 1998; 24: 405-8.
 131. Griffe M, SS P, Miller C, Kafrawy A, Newton C. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1980; 50: 457-61.
 132. Van Winkelhoff AJ, Carlee AW, De Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. Infect Immunol 1985; 49: 494-7.
 133. Haapasalo M. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. Immunol Med Microbiol 1993; 6: 213-8.
 134. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J Endod 1992; 18: 558-61.
 135. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J 1994; 27: 291-8.
 136. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. J Endod 1997; 23: 433-8.
 137. Gonçalves RB, Mouton C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. J Endod 1999; 25: 336-40.
 138. Nissan R, Makkar SR, Sela MN, Stevens R. Whole genomic DNA probe for detection of *Porphyromonas endodontalis*. J Endod 2000; 26: 217-20.
 139. Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Shobe Z. DNA analysis of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth. J Dent Res 1999; 78: 527 (Spec. Issue, Abstr. 3376).
 140. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod 1990; 16: 580-8.
 141. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Dent Traumatol 1995; 11: 6-9.

-
142. Waltimo TMT, Ørstavik D, Samaranayake LP, Haapasalo MPP. *Candida albicans* biotypes in persistent root canal infections in a Finnish population. J Dent Res 2000; 79: 476 (Spec. Iss. Abstr. 2659).
 143. Watts CM, Baumgartner JC, Xia T. Detection of *Candida albicans* in infected root canals using PCR. J Dent Res 2000; 79: 157 (Spec. Iss. Abstr. 110).
 144. Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. J Endod 2000; 26: 236-9.
 145. Waltimo TMT, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo M. In vitro yeast infection of human dentin. J Endod 2000; 26: 207-9.
 146. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987; 66: 1375-9.
 147. Perez F, Calas P, de Falguerolles A, Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. J Endod 1993; 19: 297-301.
 148. Massler M, Pawlak J. The affected and infected pulp. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1977; 43: 929-47.
 149. Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod 1987; 13: 29-39.
 150. Grossman L. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. J Dent Res 1967; 46: 551-3.
 151. Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. J Endod 1990; 16: 534-8.
 152. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. Endod Dent Traumatol 1987; 3: 86-90.
 153. Iwu C, MacFarlane TW, MacKenzie D, Stenhouse D. The microbiology of periapical granulomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1990; 69: 502-5.
 154. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. Endod Dent Traumatol 1990; 6: 73-7.
 155. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. J Endod 1992; 18: 152-5.
 156. Kiryu T, Hoshino E, Iwaku M. Bacteria invading periapical cementum. J Endod 1994; 20: 169-73.
 157. Kuhlrow S. Mikrobiologische, histopathologische und radiologische Untersuchung pathologischer Veränderungen des Periapex in beiden Dentitionen. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin 1997.
 158. Abou Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. Int Endod J 1998; 31: 39-47.

-
159. Hollis AW, Andreana S, DiFlorio JM et al. Periapical cementum as possible reservoir for endodontic reinfection. *J Dent Res* 1999; 78: 424 (Spec. Iss. Abstr. 2546).
 160. Sunde PT, Olsen I, Lind PO, Tronstad L. Extraradicular infection: a methodological study. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 84-90.
 161. Pitt Ford TR. The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. *Int Endod J* 1982; 15: 16-22.
 162. Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod* 1992; 18: 216-27.
 163. Dahlén G, Haapasalo M. Microbiology of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford T, Herausgeber. *Essential Endodontology*. Blackwell Science, Oxford 1998: 107-30.
 164. Muschol A, Speer U. *Medizinische Mikrobiologie*. Mediscript, München 1981.
 165. Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter, Berlin 1982.
 166. Liesenhoff T, Lenz H, Seiler T. Wurzelkanalaufbereitung mit Eximer-Laserstrahlen. *Zahnärztl Woche* 1989; 98: 1034-9.
 167. Gutknecht N, Kaiser F, Hassan A, Lampert F. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 7-11.
 168. Klinké T, Pöschmann M, Klimm W. Tiefendekontamination von Wurzelkanalwanddentin mit Nd:YAG-Laserlicht. *Dtsch Zahnärztl Z* 1999; 54: 253-7.
 169. Haffner C, Benz C, Mehl A, Folwaczny M, Hickel R. High-frequency current in endodontic therapy: an in vitro study. *J Dent Res* 1999; 78: 117 (Spec. Iss. Abstr. 89).
 170. Lussi A, Nussbacher U, Grosrey J. A novel noninstrumented technique for cleansing the root canal system. *J Endod* 1993; 19: 549-53.
 171. Lussi A, Messerli L, Hotz P, Grosrey J. A new non-instrumental technique for cleaning and filling root canals. *Int Endod J* 1995; 28: 1-6.
 172. Lussi A, Schroeder A, Hotz P, Stich H. Cleansing and obturation of the root canal system without conventional instrumentation. *Aust Endod Newsletter* 1997; 23: 16-19.
 173. Ørstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J* 1991; 24: 1-7.
 174. Yared GM, Dagher FE. Influence of apical enlargement on bacterial infection during treatment of apical periodontitis. *J Endod* 1994; 20: 535-7.
 175. Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998; 24: 763-7.

-
176. Siqueira Junior JF, Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. J Endod 1999; 25: 332-5.
 177. Spångberg L. Intracanal medications. In: Ingle JI, Bakland LK, Herausgeber. Endodontics. Williams and Wilkins, Baltimore 1994: 627-40.
 178. Kühlfluck I. Untersuchungen zur Eignung von Peressigsäure zur Wurzelkanalinfektion. Dissertation. Universität Schwerin, Schwerin 1978.
 179. Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in treatment of infected wounds. Brit Med J 1915; 2: 318-320.
 180. Dakin HD. The antiseptic action of hypochlorites: the ancient history of the "new antiseptic". Brit Med J 1915; 2: 809-10.
 181. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. J Endod 1978; 4: 60-4.
 182. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod 1988; 14: 125-7.
 183. Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. Endod Dent Traumatol 1992; 8: 104-8.
 184. Yang SF, Rivera EM, Baumgardner KR, Walton RE, Stanford C. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. J Endod 1995; 21: 613-6.
 185. Türkün M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. Int Endod J 1997; 30: 335-42.
 186. Thé SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1979; 47: 558-61.
 187. Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1980; 49: 175-7.
 188. Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. J Endod 1982; 8: 59-66.
 189. Haight Ponce E, Endo H, Horiuchi H. Endotoxin activity measured by limulus assay. Endod Dent Traumatol 1999; 15: 109-12.
 190. Dahlén G, Magnusson BC, Möller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. Archs Oral Biol 1981; 26: 591-8.

-
191. Mattsby-Baltzer I, Lindgren K, Lindholm B, Edebo L. Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. *Infect Immun* 1991; 59: 689-95.
 192. Buck RA, Eleazer PD, Staat RH. In vitro disinfection of human dentinal tubules. *J Dent Res* 1999; 78: 378 (Spec. Iss. Abstr. 2253).
 193. Calas P, Rochd T, Druilhet P, Azais JM. In vitro adhesion of two strains of *Prevotella nigrescens* to the dentin of the root canal: the part played by different irrigation solutions. *J Endod* 1998; 24: 112-5.
 194. Shuping G, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using Nickel-Titanium rotary instrumentation and various medicaments. *J Endod* 1999; 26: 751-5.
 195. Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effect of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effects of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 36: 856-71.
 196. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999; 25: 351-3.
 197. Siqueira Junior JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5% and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000; 26: 331-4.
 198. Seichter U, van der Schelling D. Bakteriologische Untersuchungen zur desinfizierenden Wirkung von Chlorhexidin als Spülmittel bei der Wurzelkanalbehandlung. *Dtsch Zahnärztl Z* 1987; 42: 763-6.
 199. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 243-8.
 200. Siqueira Junior JF, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998; 24: 414-6.
 201. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* 1999; 32: 99-102.
 202. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18: 35-40.
 203. Ferguson JW, Sarich SJ, Hatton JF, Gillespie MJ. Efficacy of common intracanal medicaments against *Candida albicans*. *J Dent Res* 2000; 79: 568 (Spec. Iss. Abstr. 3400).
 204. Haikel Y, Gorce F, Allemann C, Voegel JC. In vitro efficiency of endodontic irrigation solutions on protein desorption. *Int Endod J* 1994; 27: 16-20.

-
205. Johnson BR, Remeikis NA. Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution. *J Endod* 1993; 19: 40-3.
 206. Cunningham WT, Joseph SW. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 50: 569-71.
 207. Sjögren U, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63: 366-70.
 208. Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA, Walton AJ. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic cavitation and its relevance. *J Endod* 1988; 14: 486-93.
 209. Stewart G, Cobe H, Rappaport H. A study of a new medicament in the chemomechanical preparation of infected root canals. *J Am Dent Assoc* 1961; 63: 33.
 210. Ingle JI, Bakland LK, Peters DL, Buchanan S, Mullaney TP. Endodontic cavity preparation. In: Ingle JI, Bakland LK, Herausgeber. *Endodontics*. Williams & Wilkins, Baltimore 1994: 92-228.
 211. Svec TA, Harrison JW. Chemomechanical removal of pulpal and dentinal debris with sodium hypochlorite and hydrogen peroxide vs normal saline solution. *J Endod* 1977; 3: 49-53.
 212. Harrison JW, Svec TA, Baumgartner JC. Analysis of clinical toxicity of endodontic irrigants. *J Endod* 1978; 4: 6-11.
 213. Foulkes DM. Some toxicological observations on chlorhexidine. *J Periodontol Res* 1973; 8: 55-7 (suppl. 12).
 214. Løe H, Rindom Schiøtt C. The effect of suppression of the microflora upon the development of dental plaque and gingivitis. In: McHugh WD, ed. *Dental Plaque*. Livingstone, Edinburgh 1970: 247-255.
 215. Winrow MJ. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. *J Periodontol Res* 1973; 8: 45-8 (Suppl. 12).
 216. Hennessy TD. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res* 1973; 8 (Suppl12): 61-7.
 217. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 255-65.
 218. Rølla G, Løe H, Rindom Schiøtt C. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Archs Oral Biol* 1971; 16: 1109-16.
 219. Davies RM, Hull PS. Plaque inhibition and distribution of chlorhexidine in Beagle dogs. *J Periodontol Res* 1973; 8: 22-27 (Suppl. 12).
 220. Emilson CG, Ericson TH, Heyden G, Magnusson BC. Uptake of chlorhexidine to hydroxyapatite. *J Periodontol Res* 1973; 8: 17-21 (Suppl. 129).
 221. Magnusson B, Heyden G. Autoradiographic studies of ¹⁴C-chlorhexidine given orally in mice. *J Periodontol Res* 1973; 8: 49-54 (Suppl. 12).

-
222. Gjermo P. Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res* 1989; 68: 1602-8 (Spec. Iss).
 223. Hirst RC, Egelberg J, Hornbuckle GC, Oliver RC, Rathbun WE. Microscopic evaluation of topically applied chlorhexidine gluconate on gingival wound healing in dogs. *JSCDA* 1973; 41: 311-7.
 224. Bassetti C, Kallenberger A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 443-56.
 225. Brennan SS, Leaper DJ. The effect of antiseptics on the healing wound: a study using the rabbit ear chamber. *Br J Surg* 1985; 72: 780-2.
 226. Brennan SS, Foster ME, Leaper DJ. Antiseptic toxicity in wounds healing by secondary intention. *J Hospital Infection* 1986; 8: 263-7.
 227. Saatman RA, Carlton WW, Hubben K, Streett CS, Tuckosh JR, DeBaecke PJ. A wound healing study of chlorhexidine digluconate in Guinea pigs. *Fundamental Appl Toxicol* 1986; 6: 1-6.
 228. Sanchiez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Hale A, Henderson RA, McGuire JA. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet Surg* 1988; 17: 291-5.
 229. Barbosa CA, Goncalves RB, Siqueira Junior JF, De Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod* 1997; 23: 297-300.
 230. Siqueira Junior JF, de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997; 23: 167-9.
 231. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53: 518-23.
 232. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994; 20: 276-8.
 233. White RE, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigant used with sodium hypochlorite. *Am J Dent* 1999; 12: 148-50.
 234. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 142-9.
 235. Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998; 31: 8-14.
 236. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod* 2000; 26: 315-7.

-
237. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod 1997; 23: 229-31.
238. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod 1999; 25: 167-71.
239. Jung S, Safavi K, Spångberg L. The effectiveness of chlorhexidine in the prevention of root canal reinfection. J Endod 1999; 25: 288 (Abstr. OR26).
240. Roach RP, Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Intracanal medicament prevention of interappointment bacterial contamination. J Dent Res 2000; 79: 569 (Spec Iss. Abstr. 3401).
241. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antibacterial activity of endodontic irrigants in the elimination of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2000; 26: 555 (Abstr. PR 10).
242. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. J Endod 1999; 25: 235-8.
243. Koskinen KP, Rahkamo A, Hakala PE. Antimicrobial effect of some endodontic medicaments in vitro. Proc Finn Dent Soc 1975; 71: 132-6.
244. Klimm W, Zeumer H, Kloss H-J, Natusch I, Wildführ W. Chlorhexidin in der therapeutischen Trias des infizierten Wurzelkanals und seiner Folgeerkrankungen. Z Stomatol 1989; 86: 131-8.
245. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. J Endod 1982; 8: 200-4.
246. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. J Endod 1998; 24: 472-6.
247. Wennberg A. Biological evaluation of root canal antiseptics using in vitro and in vivo methods. Scand J Dent Res 1980; 88: 46-52.
248. Klimm W, Krause L, Krause P, Wenzel J. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Toxizität verschiedener Wurzelkanalantiseptika. Stomatol DDR 1989; 39: 153-5.
249. Aibel K, Stevens R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. J Endod 1999; 25: 282 (Spec. Iss. Abstr. OR 1).
250. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1985; 1: 170-5.
251. Messer HH, Chen RS. The duration of effectiveness of root canal medicaments. J Endod 1984; 10: 240-5.

-
252. Fager FK, Messer HH. Systemic distribution of camphorated monochlorophenol from cotton pellets sealed in pulp chambers. *J Endod* 1986; 12: 225-30.
 253. Messer HH, Feigal RJ. A comparison of the antibacterial and cytotoxic effects of parachlorophenol. *J Dent Res* 1985; 64: 818-21.
 254. Akpata ES. Effect of endodontic procedures on the population of viable microorganisms in the infected root canal. *J Endod* 1976; 2: 369-73.
 255. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9: 249-53.
 256. Siqueira Junior JF, Lopes HP, de Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod* 1998; 24: 11-4.
 257. Safavi KE, Dowden WE, Introcaso JH, Langeland K. A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine-potassium iodide. *J Endod* 1985; 11: 454-6.
 258. Hermann BW. Kalziumhydroxid als Mittel zum Behandeln und Füllen von Zahnwurzelkanälen. Dissertation. Würzburg 1920.
 259. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1980; 7: 17-21.
 260. Nyborg H. Capping of the pulp. The processes involved and their outcome. Dissertation. Royal School of Dentistry, Stockholm, Göteborg 1958.
 261. Tronstad L, Mjör IA. Capping of the inflamed pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; 34: 477-85.
 262. Haskell EW, Stanley HR, Chellemi J, Stringfellow H. Direct pulp capping treatment: a long-term follow up. *J Am Dent Assoc* 1978; 87: 607-12.
 263. Heyduck G, Wegner H. Klinische, röntgenologische und histologische Ergebnisse nach Vitalbehandlung der freigelegten Pulpa. *Stomatol DDR* 1978; 29: 614-9.
 264. Fuks AB, Bielak S, Chosak A. Clinical and radiographic assessment of direct pulp capping and pulpotomy in young permanent teeth. *Pediat Dent* 1982; 4: 240-4.
 265. Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp migration , proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64 (Spec Iss): 541-48.
 266. Fuks AB, Chosack A, Klein H, Eidelman E. Partial pulpotomy as a treatment alternative for exposed pulps in crown-fractured permanent incisors. *Endod Dent Tramadol* 1987; 3: 100-2.

-
267. Attin T, Hellwig E. Erfolgsaussichten der direkten Pulpaüberkappung bei Zähnen mit Caries profunda. *Quintessenz* 1993; 44: 1613-22.
 268. Tidmarsh BG. Accidental perforation of the roots of teeth. *J Oral Rehabil* 1979; 6: 235-40.
 269. Biggs JT, Benenati FW, Sabala CL. Treatment of iatrogenic root perforations with associated osseous lesions. *J Endod* 1988; 14: 620-4.
 270. Michanowicz JP, Michanowicz AE. A conservative approach and procedure to fill an incompletely formed root using calcium hydroxide as an adjunct. *J Dent Child* 1967; 34: 4247.
 271. Heithersay GS. Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970; 29: 620-30.
 272. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odont Revy* 1972; 23: 27-44.
 273. Binnie WH, Rowe AHR. A histological study of the periapical tissues of incompletely formed pulpless teeth filled with calcium hydroxide. *J Dent Res* 1973; 52: 1110-6.
 274. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. IV. Periodontal healing and closure of the root canal in the coronal fragment of teeth with intra-alveolar fracture and vital apical fragment. A follow-up. *Odont Revy* 1974; 25: 239-49.
 275. Cvek M, Sundström B. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. V. Histologic appearance of roentgenographically demonstrable apical closure of immature roots. *Odont Revy* 1974; 25: 379-92.
 276. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Brit Endod Soc* 1975; 8: 74-93.
 277. Gilbert B. Endodontic treatment of the open apex. *Quintessence Int* 1983; 14: 293-9.
 278. Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod* 1993; 19: 348-52.
 279. Cox CF, Suzuki S. Re-evaluation pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc* 1994; 125: 823-30.
 280. Sciaky I, Pisanti S. Localization of calcium placed over amputated pulps in dogs' teeth. *J Dent Res* 1960; 39: 1128-32.
 281. Pisanti S, Sciaky I. Origin of calcium in the repair after pulp exposure in the dog. *J Dent Res* 1964; 43: 641-4.

-
282. Freeman K, Ludington JR, Svec TA, Pinero GJ, Hoover J. Continuously infused calcium hydroxide: its influence on hard tissue repair. *J Endod* 1994; 20: 272-5.
283. Hanlon RJ, Wucherpfennig AL, Green DB. Osteogenic potential of calcium-containing biomaterials. *J Endod* 1998; 24: 297 (Abstr. 31).
284. Wadachi R, Araki K, Suda H. Effect of calcium hydroxide on the dissolution of soft tissue on the root canal wall. *J Endod* 1998; 24: 326-30.
285. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-25.
286. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 1993; 19: 302-6.
287. König KG. *Karies und Parodontopathien*. Thieme, Stuttgart 1987.
288. Molander A, Reit C, Dahlén G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals pretreated with 5% iodine potassium iodide. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15: 205-9.
289. Porkaew P, Retief DH, Barfield RD, Lacefield WR, Soong SJ. Effects of calcium hydroxide paste as an intracanal medicament on apical seal. *J Endod* 1990; 16: 369-74.
290. Holland R, Alexandre AC, Murata SS, dos Santos CA, Dezan E J. Apical leakage following root canal dressing with calcium hydroxide. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 261-3.
291. Kontakiotis EG, Wu MK, Wesselink PR. Effect of calcium hydroxide dressing on seal of permanent root filling. *Endod Dent Traumatol* 1997; 13: 281-4.
292. Wu M-K, Kontakiotis EG, Wesselink PR. Decoloration of 1% methylene blue solution in contact with dental filling materials. *J Dent* 1998; 26: 585-9.
293. Lage-Marques JL, Simões E, Boldrini E, Salazar-Silva JR. Ca(OH)₂-penetration into dentinal tubules relating to the intracanal dressing application. *J Dent Res* 1997; 76: 306 (Spec. Iss. Abstr. 2337).
294. Bender IB, Seltzer S. Combination of antibiotics and fungicides used in treatment of the infected pulpless tooth. *J Am Dent Assoc* 1952; 45: 293-300.
295. Grahnén H, Krasse B. The effect of instrumentation and flushing of non-vital teeth in endodontic therapy. *Odontol Revy* 1963; 14: 167-77.
296. Engström B. The significance of *Enterococci* in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15: 87-106.
297. Goldman M, Pearson AH. Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 28: 897-905.

-
298. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. J Endod 1998; 24: 15-7.
 299. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. J Endod 1999; 25: 416-8.
 300. Waltimo TM, Sirén EK, Ørstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. Int Endod J 1999; 32: 94-8.
 301. Barbosa SV, Spångberg LS, Almeida D. Low surface tension calcium hydroxide solution is an effective antiseptic. Int Endod J 1994; 27: 6-10.
 302. Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Radiographic evaluation of periapical repair following obturation of infected root canals in dogs. J Endod 1998; 24: 2948 (Abstr. PR 33).
 303. Calt S, Serper A, Ozcelik B, Dalat MD. pH changes and calcium ion diffusion from calcium hydroxide dressing materials through root dentin. J Endod 1999; 25: 329-31.
 304. Economides N, Koulaouzidou EA, Beltes P, Kortsaris AH. In vitro release of hydroxyl ions from calcium hydroxide gutta-percha points. J Endod 1999; 25: 481-2.
 305. Podbielski A, Boeckh C, Haller B. Growth inhibitory activity of gutta-percha points containing root canal medications on common endodontic bacterial pathogens as determined by an optimized quantitative in vitro assay. J Endod 2000; 26: 398-403.
 306. Distler W, Petschelt A. Über die Freisetzung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ aus Guttaperchaspitzen. Dtsch Zahnärztl Z 1997; 52: 199-201.
 307. Lueders A, Raab WH-M. Studies on the antimicrobial activity of calcium hydroxide containing gutta-percha points and $\text{Ca}(\text{OH})_2$. J Dent Res 1998; 77: 668 (Spec. Iss. Abstr. 296).
 308. Schäfer E, Al Behaissi A. Alkalisierende Wirkung von Kalziumhydroxid-haltigen Guttaperchastiften auf das Wurzelkanal-dentin. Dtsch Zahnärztl Z 1999; 54: 614-8.
 309. Ebert J, Spiller S, Petschelt A. Einfluß von kalziumhydroxidhaltigen Guttaperchaspitzen auf die Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen in schmierschichtfreien Wurzelkanälen. Dtsch Zahnärztl Z 1997; 52: 126-8.
 310. Sirén E, Lavonius E, Kerosuo E. Effect of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gutta-percha points in root canals. J Dent Res 2000; 79: 543 (Spec. Iss. Abstr. 3194).
 311. Ebert J, Oberschachtsiek H, Petschelt A. A clinical study on $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -releasing gutta-percha points. J Dent Res 1998; 77: 696 (Spec. Iss. Abstr. 514).
 312. Barbakow F, Lutz F, Toth L. Materials and technics in root canal treatments in Switzerland - a determination of their status. Schweiz Monatsschr Zahnmed 1995; 105: 1265-71.

-
313. Wolfsohn BL. The role of hydrocortisone in the control of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1954; 7: 314-21.
 314. Blitzner MH. Root canal therapy: use of a combination of antibacterial agents, hydrocortisone and hyaluronidase. *N Y State Dent J* 1956; 22: 503-8.
 315. Heling I, Pecht M. Efficacy of Ledermix paste in eliminating *Staphylococcus aureus* from infected dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 251-4.
 316. Santini A. The clinical assessment of the pulpotomy technique on teeth of various post-eruptive age groups. A four year assessment using standardized clinical methods (II). *Quintessence Int* 1990; 11: 77-80.
 317. Eifinger FF. Beitrag zur Glukokortikoid-Therapie der Pulpitis. *Dtsch Zahnärztl Z* 1965; 20: 1206-19.
 318. Jaeggi S. Ledermix und die Formation von Sekundärdentin. *Quintessenz* 1965; 16: 37-8.
 319. Götze W. Zur Frage der Eindringtiefe des Tetracyclin bei der Behandlung der Pulpitis mit Ledermix. *Dtsch Zahnärztl Z* 1966; 21: 974-7.
 320. Beissner H. Vergleichend-sequentialanalytische, kurzfristige klinische Prüfung einiger Stoffe auf ihre Wirkung als potentielle Pulpitismittel. *Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1968; 78: 674-84.
 321. Eifinger FF. Klinische und histologische Befunde bei der Glucokortikoid-Therapie der Pulpitis. *Dtsch Zahnärztl Z* 1968; 23: 239-45.
 322. Kipfer B. Vergleichend-sequentialanalytische, kurzfristige klinische Prüfung einiger Stoffe auf ihre Wirkung als potentielle Pulpitismittel. *Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1968; 78: 685-92.
 323. Langeland K, Langeland LK, Anderson DM. Corticosteroids in dentistry. *Int Dent J* 1977; 27: 217-51.
 324. Klähn KH. Klinische Erfahrungen mit Ledermix bei modifizierter Vitalamputation an Milchzähnen. *Zahnärztl Prax* 1980; 31: 453-4.
 325. Ehrmann EH. Pulpotomies in traumatized and carious permanent teeth using a corticosteroid-antibiotic preparation. *Int Endod J* 1981; 14: 149-56.
 326. Paterson RC. Pulp response in sound and carious teeth: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 51: 209-12.
 327. Ivanovic V, Santini A. Rate of formation of tertiary dentin in dogs' teeth in response to lining materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67: 684-8.
 328. Taylor MA, Humen WR, Heithersay GS. Some effects of Ledermix paste and Pulpdent paste on mouse fibroblasts and on bacteria in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 266-73.
 329. Hume WR, Massey WL. Keeping the pulp alive: the pharmacology and toxicology of agents applied to dentine. *Aust Dent J* 1990; 35: 32-7.

-
330. Kirk EE, Meyer MJ. Morphology of the mineralizing front and observations of reparative dentine following induction and inhibition of dentinogenesis in the rat incisor. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 195-201.
 331. Seow WK, Thong YH. Evaluation of the novel anti-inflammatory agent tetrandrine as pulpotomy medicament in a canine model. *Pediatr Dent* 1993; 15: 260-6.
 332. Santini A, Ivanovic V. The quantification of tertiary dentine formation in response to materials commonly placed in deep cavities in general practice in the UK. *Prim Dent Care* 1996; 3: 14-22.
 333. Sazak H, Günday M, Alatli C. Effect of calcium hydroxide and combinations of Ledermix and calcium hydroxide on inflamed pulp in dog teeth. *J Endod* 1996; 22: 447-9.
 334. Trope M. Relationship of intracanal medicaments to endodontic flare-ups. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 226-9.
 335. Marshall JG, Liesinger AW. Factors associated with endodontic posttreatment pain. *J Endod* 1993; 19: 573-5.
 336. Ehrmann EH. The endodontic management of the acute pulpal or periapical lesion. *Aust Dent J* 1972; 17: 279-82.
 337. Abbott PV, Heithersay GS, Hume WR. Release and diffusion through human tooth roots in vitro of corticosteroid and tetracycline trace molecules from Ledermix paste. *Endod Dent Traumatol* 1988; 4: 55-62.
 338. Abbott PV, Hume WR, Heithersay GS. The release and diffusion through human coronal dentine in vitro of triamcinolone and demeclocycline from Ledermix paste. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 92-7.
 339. Motsch A, van Thiel R, Haas G. Klinische und bakteriologische Untersuchungen verschiedener Kortikoidpräparate zur Pulpitistherapie. *Dtsch Zahnärztl Z* 1968; 23: 233-9.
 340. Bjorvatn K, Skaug N, Selvig KA. Tetracycline-impregnated enamel and dentin: duration of antimicrobial capacity. *Scand J Dent Res* 1985; 93: 192-7.
 341. Abbott PV. Systemic release of corticosteroids following intra-dental use. *Int Endod J* 1992; 25: 189-91.
 342. Ingle JJ, Beveridge E, Glick D, Weichman J. The Washington study. In: Ingle JJ, Bakland LK, Herausgeber. *Endodontics*. Williams & Wilkins, Baltimore 1994: 25-44.
 343. Donnelly JC. Resolution of a periapical radiolucency without root canal filling. *J Endod* 1990; 16: 394-5.
 344. Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, Herausgeber. *Essential Endodontology*. Blackwell Science, Oxford 1998: 242-77.

-
345. Rhein ML. Root Technic Film. New York: Clinical Film, 1917:
 346. Portmann P, Lussi A. A comparison between a new vacuum obturation technique and lateral condensation: an in vitro study. *J Endod* 1994; 20: 292-5.
 347. Barry GN, Heyman RA, Elias A. Comparison of apical sealing methods. A preliminary report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975; 39: 806-11.
 348. Fogel BB. A comparative study of five materials for use in filling root canal spaces. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977; 43: 284-99.
 349. Russin TP, Zardiackas LD, Reader A, Menke RA. Apical seals obtained with laterally condensed, chloroform-softened gutta-percha and laterally condensed gutta-percha and Grossman's sealer. *J Endod* 1980; 6: 678-82.
 350. Zmener O. Evaluation of the apical seal obtained with endodontic implant stabilizers and different cementing materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 52: 635-9.
 351. Spradling PM, Senia ES. The relative sealing ability of paste-type filling materials. *J Endod* 1982; 8: 543-9.
 352. Ishley DJ, ElDeeb ME. An in vitro assessment of the quality of apical seal of thermomechanically obturated canals with and without sealer. *J Endod* 1983; 9: 242-5.
 353. ElDeeb ME. The sealing ability of injection-molded thermoplasticized gutta-percha. *J Endod* 1985; 11: 84-6.
 354. Beatty RG, Vertucci FJ, Zakariasen KL. Apical sealing efficacy of endodontic obturation techniques. *Int Endod J* 1986; 19: 237-41.
 355. Kennedy WA, Walker WA, Gough RW. Smear layer removal effects on apical leakage. *J Endod* 1986; 12: 21-7.
 356. Kersten HW, Fransman R, Thoden van Velzen SK. Thermomechanical compaction of gutta-percha. I. A comparison of several compaction procedures. *Int Endod J* 1986; 19: 125-33.
 357. Kersten HW, Fransman R, Thoden van Velzen SK. Thermomechanical compaction of gutta-percha. II. A comparison with lateral condensation in curved root canals. *Int Endod J* 1986; 19: 134-40.
 358. Beatty RG. The effect of standard or serial preparation on single cone obturation. *Int Endod J* 1987; 20: 276-81.
 359. Mann SR, McWalter GM. Evaluation of apical seal and placement control in straight and curved canals obturated by laterally condensed and thermoplasticized gutta-percha. *J Endod* 1987; 13: 10-7.
 360. Zmener O. Evaluation of the apical seal obtained with two calcium hydroxide based endodontic sealers. *Int Endod J* 1987; 20: 87-90.

-
361. Beatty RG, Vertucci FJ, Hojjatie B. Thermomechanical compaction of gutta-percha: effect of speed and duration. *Int Endod J* 1988; 21: 367-75.
 362. Hatton JF, Ferrillo PJ, Jr., Wagner G, Stewart GP. The effect of condensation pressure on the apical seal. *J Endod* 1988; 14: 305-8.
 363. LaCombe JS, Campbell AD, Hicks ML, Pelleu GB, Jr. A comparison of the apical seal produced by two thermoplasticized injectable gutta-percha techniques. *J Endod* 1988; 14: 445-50.
 364. Beatty RG, Baker P, Haddix J, Hart F. The efficacy of four root canal obturation techniques in preventing apical dye penetration. *J Am Dent Assoc* 1989; 119: 633-7.
 365. Ciucchi B, Khettabi M, Holz J. The effectiveness of different endodontic irrigation procedures on the removal of the smear layer: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J* 1989; 22: 21-8.
 366. Narracott P. An in vitro comparison of the single cone and lateral condensation techniques using "friction-fitted" and "solvent dip-filled" primary gutta-percha cones. *Aust Dent J* 1989; 34: 49-51.
 367. Greene HA, Wong M, Ingram TA. Comparison of the sealing ability of four obturation techniques. *J Endod* 1990; 16: 423-8.
 368. Haddix JE, Jarrell M, Mattison GD, Pink FE. An in vitro investigation of the apical seal produced by a new thermoplasticized gutta-percha obturation technique. *Quintessence Int* 1991; 22: 159-63.
 369. Limkangwalmongkol S, Burtscher P, Abbott PV, Sandler AB, Bishop BM. A comparative study of the apical leakage of four root canal sealers and laterally condensed gutta-percha. *J Endod* 1991; 17: 495-9.
 370. Simons J, Ibanez B, Friedman S, Trope M. Leakage after lateral condensation with finger spreaders and D-11-T spreaders. *J Endod* 1991; 17: 101-4.
 371. Limkangwalmongkol S, Abbott PV, Sandler AB. Apical dye penetration with four root canal sealers and gutta-percha using longitudinal sectioning. *J Endod* 1992; 18: 535-9.
 372. Oguntebi BR, Shen C. Effect of different sealers on thermoplasticized gutta-percha root canal obturations. *J Endod* 1992; 18: 363-6.
 373. Scott AC, Vire DE, Swanson R. An evaluation of the Thermafil endodontic obturation technique. *J Endod* 1992; 18: 340-3.
 374. Smith DW, Wong M. Comparison of apical leakage in teeth obturated with a polyamide varnish or zinc oxide and eugenol cement using lateral condensation. *J Endod* 1992; 18: 25-7.
 375. Dummer PM, Kelly T, Meghji A, Sheikh I, Vanitchai JT. An in vitro study of the quality of root fillings in teeth obturated by lateral condensation of gutta-percha or Thermafil obturators. *Int Endod J* 1993; 26: 99-105.

-
376. Gençoglu N, Samani S, Gunday M. Evaluation of sealing properties of Thermafil and Ultrafil techniques in the absence or presence of smear layer. *J Endod* 1993; 19: 599-603.
 377. Hasegawa M, Tanaka S, Satake S, Shimizu A, Yoshioka W. An experimental study of the sealing ability of a dentinal apical plug treated with bonding agent. *J Endod* 1993; 19: 570-2.
 378. Dummer PM, Lyle L, Rawle J, Kennedy JK. A laboratory study of root fillings in teeth obturated by lateral condensation of gutta-percha or Thermafil obturators. *Int Endod J* 1994; 27: 32-8.
 379. Hülsmann M, Meiert I. Apikale Dichtigkeit thermoplastischer Wurzelkanalfüllungen. *Dtsch Zahnärztl Z* 1994; 49: 507-11.
 380. Rybicki R, Zillich R. Apical sealing ability of Thermafil following immediate and delayed post space preparations. *J Endod* 1994; 20: 64-6.
 381. Niss H, Jepsen S, Griesinger HR, Albers HK. Thermoplastische und konventionelle Guttapercha-Wurzelkanalfülltechniken. *Dtsch Zahnärztl Z* 1996; 51: 627-30.
 382. O'Neill KJ, Pitts DL, Harrington GW. Evaluation of the apical seal produced by the McSpadden compactor and the lateral condensation with a chloroform-softened primary cone. *J Endod* 1983; 9: 190-7.
 383. Evans JT, Simon JH. Evaluation of the apical seal produced by injected thermoplasticized gutta-percha in the absence of smear layer and root canal sealer. *J Endod* 1986; 12: 100-7.
 384. Madison S, Swanson K, Chiles SA. An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part II. Sealer types. *J Endod* 1987; 13: 109-12.
 385. Barkhordar RA, Bui T, Watanabe L. An evaluation of sealing ability of calcium hydroxide sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 68: 88-92.
 386. Haas SB, Campbell AD, Hicks ML, Pelleu GB, Jr. A comparison of four root canal filling techniques. *J Endod* 1989; 15: 596-601.
 387. Olson AK, Hartwell GR, Weller RN. Evaluation of the controlled placement of injected thermoplasticized gutta-percha. *J Endod* 1989; 15: 306-9.
 388. Yancich PP, Hartwell GR, Portell FR. A comparison of apical seal: chloroform versus eucalyptol-dipped gutta-percha obturation. *J Endod* 1989; 15: 257-60.
 389. Baumgardner KR, Krell KV. Ultrasonic condensation of gutta-percha: an in vitro dye penetration and scanning electron microscopic study. *J Endod* 1990; 16: 253-9.
 390. Lares C, ElDeeb ME. The sealing ability of the Thermafil obturation technique. *J Endod* 1990; 16: 474-9.
 391. Luccy CT, Weller RN, Kulild JC. An evaluation of the apical seal produced by lateral and warm lateral condensation techniques. *J Endod* 1990; 16: 170-2.

-
392. Sleder FS, Ludlow MO, Bohacek JR. Long-term sealing ability of a calcium hydroxide sealer. *J Endod* 1991; 17: 541-3.
 393. Chohayeb AA. Microleakage comparison of apical seal of plastic versus metal Thermafil root canal obturators. *J Endod* 1992; 18: 613-5.
 394. Chohayeb AA. Comparison of conventional root canal obturation techniques with Thermafil obturators. *J Endod* 1992; 18: 10-2.
 395. Hata G, Kawazoe S, Toda T, Weine FS. Sealing ability of Thermafil with and without sealer. *J Endod* 1992; 18: 322-6.
 396. McMurtrey LG, Krell KV, Wilcox LR. A comparison between Thermafil and lateral condensation in highly curved canals. *J Endod* 1992; 18: 68-71.
 397. Chohayeb AA. Evaluation of the apical condensation of gutta-percha by a tapered/calibrated spreader/plugger. *J Endod* 1993; 19: 167-9.
 398. Clark DS, ElDeeb ME. Apical sealing ability of metal versus plastic carrier Thermafil obturators. *J Endod* 1993; 19: 4-9.
 399. Dickson SS, Peters DD. Leakage evaluation with and without vacuum of two gutta-percha fill techniques. *J Endod* 1993; 19: 398-403.
 400. Fabra Campos H. Experimental apical sealing with a new canal obturation system. *J Endod* 1993; 19: 71-5.
 401. Karagöz-Küçükay I, Küçükay S, Bayirli G. Factors affecting apical leakage assessment. *J Endod* 1993; 19: 362-5.
 402. Attin T, Rettig P, Hilgers RD, Hellwig E. Die apikale Dichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen. *Dtsch Zahnärztl Z* 1994; 49: 955-8.
 403. Brown RC, Jackson CR, Skidmore AE. An evaluation of apical leakage of a glass ionomer root canal sealer. *J Endod* 1994; 20: 288-91.
 404. Karagöz-Küçükay I. Root canal ramifications in mandibular incisors and efficacy of low-temperature injection thermoplasticized gutta-percha filling. *J Endod* 1994; 20: 236-40.
 405. Koch K, Min PS, Stewart GG. Comparison of apical leakage between Ketac Endo sealer and Grossman sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 784-7.
 406. Leung SF, Gulabivala K. An in-vitro evaluation of the influence of temperature of plasticization on the sealing ability of Thermafil. *Int Endod J* 1994; 27: 39-44.
 407. Saunders WP, Saunders E. Influence of smear layer on the coronal leakage of Thermafil and laterally condensed gutta-percha root fillings with a glass ionomer sealer. *J Endod* 1994; 20: 155-8.
 408. Smith MA, Steiman HR. An in vitro evaluation of microleakage of two new and two old root canal sealers. *J Endod* 1994; 20: 18-21.

-
409. Sen BH, Piskin B, Baran N. The effect of tubular penetration of root canal sealers on dye microleakage. *Int Endod J* 1996; 29: 23-8.
 410. Buchalla W, Attin T, Brücklmeier R, Hellwig E. Computergestützte Methode zur quantitativen Bestimmung der apikalen Undichtigkeit von Wurzelkanalfüllungen. *Dtsch Zahnärztl Z* 1999; 54: 244-8.
 411. Grieve A, Parkholm J. The sealing properties of root filling cements. *Brit Dent J* 1973; 135: 327-31.
 412. Kerekes K, Rowe AH. Thermo-mechanical compaction of gutta-percha root filling. *Int Endod J* 1982; 15: 27-35.
 413. Lutz M, Klimek J, Hellwig E. Ein Vergleich zweier thermomechanischer und konventioneller Wurzelkanal-Füllungstechniken in vitro. *Dtsch Zahnärztl Z* 1986; 41: 788-91.
 414. Bradshaw GB, Hall A, Edmunds DH. The sealing ability of injection-moulded thermoplasticized gutta-percha. *Int Endod J* 1989; 22: 17-20.
 415. Parris L, Kapsimalis P. The effect of temperature change on the sealing properties of temporary filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1960; 13: 982-9.
 416. Barthel CR, Kostka EC, Roulet J-F. The effect of irrigants and filling techniques on microleakage. *J Dent Res* 1993; 72: (Spec. Iss. Abstr. 95).
 417. Barthel C, Kautz H, Roulet J-F. Die Dichtigkeit thermoplastischer Wurzelkanalfüllungen in geraden und gekrümmten Kanälen in vitro. *Dtsch Zahnärztl Z* 1994; 49: 939-42.
 418. Barthel CR, Lösche GM, Zimmer S, Roulet J-F. Dye penetration in root canals filled with AH26 in different consistencies. *J Endod* 1994; 20: 436-9.
 419. Barthel CR, Noack MJ, Roulet JF. Die Dichtigkeit von Ketac Endo und AH26 in Abhängigkeit der Fülltechnik in vitro. *Dtsch Zahnärztl Z* 1994; 49: 285-8.
 420. Barthel CR, Trope M, Roulet JF. Leakage of a new sealer combined with different filling techniques. *J Endod* 1995; 21: 231 (Abstr. PC1).
 421. Barthel CR, Moshonov J, Shuping G, Ørstavik D. Bacterial leakage versus dye leakage in obturated root canals. *Int Endod J* 1999; 32: 370-5.
 422. Messing J. An investigation of the sealing properties of some root filling materials. *J Brit Endod Soc* 1970; 3: 18-22.
 423. Skinner RL, Himel VT. The sealing ability of injection-molded thermoplasticized gutta-percha with and without the use of sealers. *J Endod* 1987; 13: 315-7.
 424. Tagger M, Tamse A, Katz A. Efficacy of apical seal of Engine Plugger condensed root canal fillings-leakage to dyes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 56: 641-6.
 425. Tagger M, Tamse A, Katz A, Tagger E. An improved method of three-dimensional study of apical leakage. *Quintessence Int* 1983; 14: 981-8.

-
426. Tagger M, Tamse A, Katz A, Korzen BH. Evaluation of the apical seal produced by a hybrid root canal filling method, combining lateral condensation and thermatic compaction. *J Endod* 1984; 10: 299-303.
 427. Metzger Z, Nissan R, Tagger M, Tamse A. Apical seal by customized versus standardized master cones: a comparative study in flat and round canals. *J Endod* 1988; 14: 381-4.
 428. Kaufman AY, Tagger M, Katz A, Yosef A. Life and AH26 as sealers in thermatically compacted gutta-percha root canal fillings: leakage to a dye. *J Endod* 1989; 15: 68-71.
 429. Smith JJ, Montgomery S. A comparison of apical seal: chloroform versus halothane-dipped gutta-percha cones. *J Endod* 1992; 18: 156-60.
 430. Roulet J-F, Beringer F. Gara didattica docenti-allievi. *Attualita Dentale* 1985; 1: 29-42.
 431. Hovland EJ, Dumsha TC. Leakage evaluation in vitro of the root canal sealer cement Sealapex. *Int Endod J* 1985; 18: 179-82.
 432. Sugawara A, Chow LC, Takagi S, Chohayeb H. In vitro evaluation of the sealing ability of a calcium phosphate cement when used as a root canal sealer-filler. *J Endod* 1990; 16: 162-5.
 433. Budd CS, Weller RN, Kulild JC. A comparison of thermoplasticized injectable gutta-percha obturation techniques. *J Endod* 1991; 17: 260-4.
 434. Amiditis C, Blackler SM, Bryant RW, Hewitt GH. The adaptation achieved by four root canal filling techniques as assessed by three methods. *Austr Dent J* 1992; 37: 439-44.
 435. Kapsimalis P, Evans R. Sealing properties of endodontic filling materials using radioactive polar and nonpolar isotopes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 22: 386-93.
 436. Brothman P. A comparative study of the vertical and the lateral condensation of gutta-percha. *J Endod* 1980; 7: 27-30.
 437. Hopkins JH, Remeikis NA, Van Cura JE. McSpadden versus lateral condensation: the extent of apical microleakage. *J Endod* 1986; 12: 198-201.
 438. Robertson DC, Leeb IJ. The evaluation of a transparent tooth model system for the evaluation of endodontically filled teeth. *J Endod* 1982; 8: 317-21.
 439. Barkins W, Montgomery S. Evaluation of Thermafil obturation of curved canals prepared by the Canal Master-U system. *J Endod* 1992; 18: 285-9.
 440. Brayton SM, Davis SR, Goldman M. Gutta-percha root canal fillings. An in vitro analysis. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 35: 226-31.
 441. Larder TC, Prescott AJ, Brayton SM. Gutta-percha: a comparative study of three methods of obturation. *J Endod* 1976; 2: 289-94.

-
442. Augsburger RA, Peters DD. Radiographic evaluation of extruded obturation materials. *J Endod* 1990; 16: 492-7.
 443. Dow PR, Ingle JJ. Isotope determination of root canal failure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1955; 8: 1100-4.
 444. Younis O, Hembree JH. Leakage of different root canal sealants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 41: 777-84.
 445. Yates JL, Hembree JH, Jr. Microleakage of three root canal cements: one-year study. *J Endod* 1980; 6: 591-3.
 446. Benner MD, Peters DD, Grower M, Bernier WE. Evaluation of a new thermoplastic gutta-percha obturation technique using ⁴⁵Ca. *J Endod* 1981; 7: 500-8.
 447. Rhome BH, Solomon EA, Rabinowitz JL. Isotopic evaluation of the sealing properties of lateral condensation, vertical condensation, and Hydron. *J Endod* 1981; 7: 458-61.
 448. Chaisrisookumporn S, Rabinowitz JL. Evaluation of ionic leakage of lateral condensation and McSpadden methods by autoradiography. *J Endod* 1982; 8: 493-6.
 449. Director RC, Rabinowitz JL, Milne RS. The short-term sealing properties of lateral condensation, vertical condensation, and Hydron using ¹⁴C human serum albumin. *J Endod* 1982; 8: 149-51.
 450. Friedman S, Shani J, Stabholz A, Kaplawi J. Comparative sealing ability of temporary filling materials evaluated by leakage of radiosodium. *Int Endod J* 1986; 19: 187-93.
 451. Canalda Sahli C, Brau Aguade E, Sentis Vilalta J, Aguade Bruix S. The apical seal of root canal sealing cements using a radionuclide detection technique. *Int Endod J* 1992; 25: 250-6.
 452. Jacobson SM, von Fraunhofer JA. The investigation of microleakage in root canal therapy. An electrochemical technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42: 817-23.
 453. Delivanis PD, Chapman KA. Comparison and reliability of techniques for measuring leakage and marginal penetration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53: 410-6.
 454. Mattison GD, von Fraunhofer JA. Electrochemical microleakage study of endodontic sealer/cements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 402-7.
 455. Osins BA, Carter JM, Shih Levine M. Microleakage of four root canal sealer cements as determined by an electrochemical technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 56: 80-8.
 456. Lim KC, Tidmarsh BG. The sealing ability of Sealapex compared with AH26. *J Endod* 1986; 12: 564-6.

-
457. Kersten HW. Evaluation of three thermoplasticized gutta-percha filling techniques using a leakage model in vitro. *Int Endod J* 1988; 21: 353-60.
 458. De Gee AJ, Wu MK, Wesselink PR. Sealing properties of Ketac-Endo glass ionomer cement and AH26 root canal sealers. *Int Endod J* 1994; 27: 239-44.
 459. Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Leakage of four root canal sealers at different thickness. *Int Endod J* 1994; 27: 304-8.
 460. Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Fluid transport and dye penetration along root canal fillings. *Int Endod J* 1994; 27: 233-8.
 461. Kersten HW, Moorer WR. Particles and molecules in endodontic leakage. *Int Endod J* 1989; 22: 118-24.
 462. Trope M, Chow E, Nissan R. In vitro endotoxin penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 90-4.
 463. Alves J, Walton R, Drake D. Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. *J Endod* 1998; 24: 587-91.
 464. Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod* 1990; 16: 566-9.
 465. Khayat A, Lee SJ, Torabinejad M. Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals. *J Endod* 1993; 19: 458-61.
 466. Torabinejad M, Kahn H, Bankes D. Isopropyl cyanoacrylate as a root canal sealer. *J Endod* 1984; 10: 304-7.
 467. Negm MM. The effect of human blood on the sealing ability of root canal sealers: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67: 449-52.
 468. Goldman M, Simmonds S, Rush R. The usefulness of dye-penetration studies reexamined. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67: 327-32.
 469. Wu MK, Wesselink PR. Endodontic leakage studies reconsidered. Part I. Methodology, application and relevance. *Int Endod J* 1993; 26: 37-43.
 470. Spångberg LS, Acierno TG, Yongbum Cha B. Influence of entrapped air on the accuracy of leakage studies using dye penetration methods. *J Endod* 1989; 15: 548-51.
 471. Starkey DL, Anderson RW, Pashley DH. An evaluation of the effect of methylene blue dye pH on apical leakage. *J Endod* 1993; 19: 435-9.
 472. Pitt Ford TR. Relation between seal of root fillings and tissue response. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 291-4.
 473. Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR, Moorer WR. Fluid transport and bacterial penetration along root canal fillings. *Int Endod J* 1993; 26: 203-8.
 474. Swanson K, Madison S. An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part I. Time periods. *J Endod* 1987; 13: 56-9.

-
475. Madison S, Wilcox LR. An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part III. In vivo study. *J Endod* 1988; 14: 455-8.
476. Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 1995; 28: 12-8.
477. Chailertvanitkul P, Saunders WP, MacKenzie D. The effect of smear layer on microbial coronal leakage of gutta-percha root fillings. *Int Endod J* 1996; 29: 242-8.
478. Chailertvanitkul P, Saunders WP, MacKenzie D, Weetman DA. An in vitro study of the coronal leakage of two root canal sealers using an obligate anaerobe microbial marker. *Int Endod J* 1996; 29: 249-55.
479. Timpawat S, Amornchat C, Trisuwan W-R. Bacterial coronal leakage after obturation with three root canal sealers. *J Endod* 2001; 27: 36-9.
480. Cerutti A, Azzini A, Putignano A. Bacterial penetration in coronally unsealed teeth after endodontic treatment. *J Dent Res* 1998; 77: 949 (Spec. Iss. Abstr. 2542).
481. Friedman S, Torneck CD, Komorowski R, Ouzounian Z, Syrtash P, Kaufman A. In vivo model for assessing the functional efficacy of endodontic filling materials and techniques. *J Endod* 1997; 23: 557-61.
482. Friedman S, Komorowski R, Maillet W, Klimaite R, Nguyen HQ, Torneck CD. In vivo resistance of coronally induced bacterial ingress by an experimental glass ionomer cement root canal sealer. *J Endod* 2000; 26: 1-5.
483. Snider D, Torabinejad M, Tang H-M, Bakland LK. Effect of root canal obturation and/or coronal seal on the success of root canal therapy. *J Endod* 1999; 25: 294 (Abstr. OR50).
484. Soluti A. Histologic study of periapical tissue reaction to endodontic treatment with and without coronal microleakage in cats. *J Endod* 2000; 26: 540 (Abstr. OR 19).
485. Rietschel ET, Schade U, Jensen M, Wollenweber H-W, Lüderitz O, Greisman SG. Bacterial endotoxins: chemical structure, biological activity and role in septicaemia. *Scand J Infect Dis* 1982; Suppl 31: 8-21.
486. Baum TD, Heard SO, Feldman HS, Latka CA, Fink MP. Endotoxin-induced myocardial depression in rats: effect of ibuprofen and SDZ 64-688 a platelet activation factor receptor antagonist. *J Surg Res* 1990; 48: 629-34.
487. Cohn SM, Fink MP, Lee PC et al. LY171883 preserves mesenteric perfusion in porcine endotoxin shock. *J Surg Res* 1990; 49: 37-44.
488. Alexander HR, Doherty GM, Buresh CM, Venzo DJ, Norton JA. A recombinant human receptor antagonist to Interleukin 1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *Experiment Med* 1991; 173: 1029-32.

-
489. Creasy AA, Stevens P, Kenney J et al. Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenges with lethal and sublethal *Escherichia coli*. *Circ Shock* 1991; 33: 84-91.
 490. Jenkins JK, Carey PD, Byrne K, Sugerman HJ, Fowler AA. Sepsis-induced lung injury and the effects of ibuprofen pretreatment. Analysis of early alveolar events vs. repetitive bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Disease* 1991; 143: 155-61.
 491. Dahlén G. Immune response in rats against lipopolysaccharides of *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides oralis* administered in the root canal. *Scand J Dent Res* 1980; 88: 122-9.
 492. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1975; 1: 19-21.
 493. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 492-5.
 494. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod* 1980; 7: 31-5.
 495. Pitts DL, Williams BL, Morton TH, Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod* 1982; 8: 10-8.
 496. Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod* 1987; 13: 559-65.
 497. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod* 1992; 18: 501-4.
 498. Niwa M, Milner KC, Ribi E, Rudbach JA. Alteration of physical, chemical, and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali. *J Bacteriol* 1969; 97: 1069-77.
 499. Thorsby E, Bratlie A. A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. In: Terasaki P, ed. *Histocompatibility Testing*. Munksgaard, Copenhagen 1970: 655-68.
 500. Cavaillon JM, Munoz C, Marty C et al. Cytokine production by monocytes from patients with sepsis syndrome and by endotoxin-tolerant human monocytes. In: Levin J, Alvin CR, Munford RS, Stütz PL, Herausgeber. *Bacterial Endotoxin: Recognition and effector mechanisms*. Excerpta Medica, Amsterdam 1993: 275-84.
 501. Moldawer L. Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. *Critical Care Med* 1994; 22: S3-7.
 502. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod* 1994; 20: 127-9.

-
503. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev Med* 1987; 38: 417-32.
504. Olsen MH, DiFiore PL, Dixit SN, Veis A. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release of IL-1 β from human monocytes in whole blood. *J Endod* 1999; 25: 289 (Abstr. OR 30).
505. Galanos C, Luederitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade L, et al. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem* 1985; 148: 1-5.
506. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993; 19: 76-8.
507. Levin LG, Trope M, Offenbacher S, Wang C-Y, Reisner HM, Baldwin AS. Inhibition of LPS-mediated NF κ B activation by calcium hydroxide. *J Dent Res* 1997; 76: 306 (Spec. Iss. Abstr. 2339).
508. Marks SC, Jr., Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988; 183: 1-44.
509. Segal H, Stevens RH, Trowbridge H, Pashley DH. Permeability of human dentin to bacterial endotoxin. *J Dent Res* 1990; 69: 355 (Spec. Iss. Abstr.).
510. Monefeldt K. Host responses in human periodontitis-lipoteichoic acid and immune reactions. Dissertation. University of Oslo, Oslo, Norway 1994.
511. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 255-65.
512. Kampf G, Höfer M, Rüden H. Inaktivierung von Chlorhexidin bei der in vitro Desinfektionsmitteltestung. *Zent Bl Hyg Umweltmed* 1998; 200: 457-64.
513. Huang HA, Komorowski R, Wong HL, Wu XY, Friedman S. Development of chlorhexidine prolonged release devices for endodontic therapy. *J Dent Res* 1998; 77: 747 (Spec. Iss. Abstr. 927).
514. Wang JD, Hume WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *Int Endod J* 1988; 21: 17-26.
515. Chailertvanitkul P, Saunders WP, Mackenzie D. An assessment of microbial coronal leakage in teeth root filled with gutta-percha and three different sealers. *Int Endod J* 1996; 29: 387-92.
516. Chailertvanitkul P, Saunders WP, Saunders EM, MacKenzie D. Polymicrobial coronal leakage of super EBA root-end fillings following two methods of root-end preparation. *Int Endod J* 1998; 31: 348-53.
517. Barthel CR, Strobach A, Briedigkeit H, Göbel UB, Roulet J-F. Leakage in roots coronally sealed with different temporary fillings. *J Endod* 1999; 25: 731-34.
518. Felton D, Bergenholtz G, Cox CF. Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. *J Dent Res* 1989; 68: 491-5.

-
519. Hörsted-Bindslev P. Monkey pulp reactions to cavities treated with GLUMA Dentin Bond and restored with a microfilled composite. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 347-55.
 520. Deveau E, Hildebert P, Neut C, Romond C. Bacterial microleakage of Cavit, IRM, TERM, and Fermit: a 21-day in vitro study. *J Endod* 1999; 25: 653-9.
 521. Pisano DM, DiFiore PM, McClanahan SB, Lautenschlager EP, Duncan JL. Intraorifice sealing of gutta-percha obturated root canals to prevent coronal microleakage. *J Endod* 1998; 24: 659-62.
 522. Lundin S-A, Noren JG, Warfvinge J. Marginal bacterial leakage and pulp reactions in Class II composite resin restorations in vivo. *Swed Dent J* 1990; 14: 185-92.
 523. Fisher RG, Quintana RP, Boulware MA. Surface-chemical studies on chlorhexidine and related compounds: I: Effects at air-water, n-hexane-water, and hydroxyapatite-water interfaces. *J Dent Res* 1975; 54: 20-4.
 524. Ben-Yaakov D, Friedman M, Hirschfeld Z, Gedalia I. Fluoride enhancement of chlorhexidine uptake by hydroxyapatite and enamel powders. *J Oral Rehabil* 1984; 11: 65-70.
 525. Sodhi RN, Grad HA, Smith DC et al. Examination by X-ray photoelectron spectroscopy of the adsorption of chlorhexidine on hydroxyapatite fluoride enhancement of chlorhexidine uptake by hydroxyapatite and enamel powders surface-chemical studies on chlorhexidine and related compounds: I. Effects at air-water, n-hexane-water, and hydroxyapatite-water interfaces. *J Dent Res* 1992; 71: 1493-7.
 526. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA et al. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. *J Periodontol* 1983; 54: 580-5.
 527. Tepel J, Darwisch el Sawaf M, Hoppe W. Reaction of inflamed periapical tissue to intracanal medicaments and root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 1994; 10: 233-8.
 528. Cervone F, Tronstad L, Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 33-6.
 529. Goodman A, Schilder H, Aldrich W. The thermomechanical properties of gutta-percha. II. The history and molecular chemistry of gutta-percha. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 954-61.
 530. Siqueira Junior JF, Rôças IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod* 1999; 25: 14-6.
 531. Grossman LI, Shepard LI, Pearson LA. Roentgenologic and clinical evaluation of endodontically treated teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1964; 17: 368-74.

-
532. Oliet S, Sorin SM. Evaluation of clinical results based upon culturing root canals. *J Brit Endod Soc* 1969; 3: 3-6.
533. Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy - a five-year retrospective study. *Int Endod J* 1993; 26: 321-33.
534. Swartz DB, Skidmore AE, Griffin JA, Jr. Twenty years of endodontic success and failure. *J Endod* 1983; 9: 198-202.
535. Strindberg L. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors. An analytic study based on radiographic and clinical follow-up examination. *Acta Odontol Scand* 1956; 14: 1-175 (Suppl 21).
536. Grahnén H, Hansson L. The prognosis of pulp and root canal therapy. *Odontol Revy* 1961; 12: 146-65.
537. Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramström G, Frostell G. Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15: 257-270.
538. Heling B, Tamshe A. Evaluation of the success of endodontically treated teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970; 30: 533-6.
539. Kerekes K, Tronstad L. Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique. *J Endod* 1979; 5: 83-90.
540. Morse DR, Esposito JV, Pike C, Furst ML. A radiographic evaluation of the periapical status of teeth treated by the gutta-percha-eucapercha endodontic method: a one-year follow-up study of 458 root canals. Part III. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 56: 190-7.
541. Morse DR, Esposito JV, Pike C, Furst ML. A radiographic evaluation of the periapical status of teeth treated by the gutta-percha-eucapercha endodontic method: a one-year follow-up study of 458 root canals. Part II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 56: 89-96.
542. Morse DR, Esposito JV, Pike C, Furst ML. A radiographic evaluation of the periapical status of teeth treated by the gutta-percha-eucapercha endodontic method: a one-year follow-up study of 458 root canals. Part I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 607-10.
543. Molven O, Halse A. Success rates for gutta-percha and Kloroperka N-0 root fillings made by undergraduate students: radiographic findings after 10-17 years. *Int Endod J* 1988; 21: 243-50.
544. Friedman S, Löst C, Zarrabian M, Trope M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer. *J Endod* 1995; 21: 384-90.
545. Grahnén H, Hansson L. The prognosis of pulp and root canal therapy. A clinical and radiographic follow-up examination. *Odontol Revy* 1961; 12: 146-65.

-
546. Seltzer S, Bender I, B, Turkenkopf S. Factors affecting successful repair after root canal therapy. *J Am Dent Assoc* 1963; 53: 651-62.
547. Bender I, Seltzer S, Turkenkopf S. To culture or not to culture? *Oral Surg Oral Med Oral Pat* 1964; 18: 527-40.
548. Storms JL. Factors that influence the success of endodontic treatment. *J Can Dent Assoc* 1969; 35: 83-97.
549. Tamse A, Heling B. Success of endodontically treated anterior teeth in young and adult patients. *Ann Dent* 1973; 32: 20-27.
550. Adenubi JO, Rule DC. Success rate for root fillings in young patients. *Brit Dent J* 1976; 141: 227-241.
551. Matsumoto T, Nagai T, Ida K et al. Factors affecting successful prognosis of root canal treatment. *J Endod* 1987; 13: 239-42.
552. Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16: 498-504.
553. Kuri CM. Klinische und röntgenologische Kontrolluntersuchung von Wurzelkanalbehandlungen nach dreijähriger Liegezeit. Dissertation. Universität Regensburg, Regensburg 1992.
554. Orth K. Der postendodontische Therapieerfolg. Dissertation. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Mainz 1994.
555. Kaiser M. Klinisch-röntgenologische Nachuntersuchung von Wurzelkanalbehandlungen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München 1998.
556. Abitbol S, Lawrence HP, Friedman S. The Toronto endodontic treatment outcome study: Phase 1 (1993-1995). Preliminary report. *J Endod* 2000; 26: 543 (Abstr. OR 32).
557. Selden HS. Pulpoperiapical disease: diagnosis and healing. A clinical endodontic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 271-83.
558. Barbakow FH, Cleaton Jones P, Friedman D. An evaluation of 566 cases of root canal therapy in general dental practice. 2. Postoperative observations. *J Endod* 1980; 6: 485-9.
559. Jokinen MA, Kotilainen R, Poikkeus P, Poikkeus R, Sarkki L. Clinical and radiographic study of pulpectomy and root canal therapy. *Scand J Dent Res* 1978; 86: 366-73.
560. Åkerblom A, Hasselgren G. The prognosis for endodontic treatment of obliterated root canals. *J Endod* 1988; 14: 565-7.
561. Bergenholtz G, Lekholm U, Milthorpe R, Heden G, Odesjö B, Engström B. Retreatment of endodontic fillings. *Scand J Dent Res* 1979; 87: 217-24.
562. Allen RK, Newton CW, Brown CE, Jr. A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *J Endod* 1989; 15: 261-6.

-
563. Friedman S. Treatment outcome and prognosis of endodontic therapy. In: Ørstavik D, Pitt Ford T, Herausgeber. *Essential Endodontology*. Blackwell Science, Oxford 1998: 367-401.
564. Hess W, Zürcher E. The anatomy of the root-canals of the teeth of the permanent dentition and the anatomy of the root-canals of the teeth of the deciduous dentition, and of the first permanent molars. John Bale, Sons & Danielsson, London 1925.
565. Pineda F, Kuttler Y. Mesiodistal and buccolingual roentgenographic investigation of 7,275 root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; 33: 101-10.
566. Lowman JV, Burke RS, Pelleu GB. Patent accessory canals: incidence in molar furcation region. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 36: 580-4.
567. Burch JG, Hulen S. A study of the presence of accessory foramina and the topography of molar furcations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 38: 451-5.
568. Koenigs JF, Brilliant JD, Foreman DW. Preliminary scanning electron microscope investigations of accessory foramina in the furcation areas of human molar teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 38: 773-82.
569. Vertucci FJ, Williams RG. Furcation canals in the human mandibular first molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 38: 308-14.
570. DeDeus QD, Horizonte B. Frequency, location, and direction of lateral, secondary, and accessory canals. *J Endod* 1975; 1: 361-6.
571. Hession RW. Endodontic morphology. II. A radiographic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977; 44: 610-20.
572. Gutmann JL. Prevalence, location and patency of accessory canals in the furcation region of permanent molars. *J Periodontol* 1978; 49: 21-6.
573. Perlich MA, Reader A, Foreman DW. A scanning electron microscopic investigation of accessory foramina on the pulpal floor of human molars. *J Endod* 1981; 7: 402-6.
574. Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 58: 589-99.
575. Barkhordar RA, Stewart GG. The potential of periodontal pocket formation associated with untreated accessory root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 70: 769-72.
576. Peters LB. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 2000; 33: 161 (Abstr).
577. Heling B, Shapira J. Roentgenologic and clinical evaluation of endodontically treated teeth, with or without negative culture. *Quintessence International* 1978; 8: 79-84.

-
578. Zeldow BJ, Ingle JJ. Correlation of the positive culture to the prognosis of endodontically treated teeth: a clinical study. *J Am Dent Assoc* 1963; 66: 23-27.
579. Appleton JLT. A note on the clinical value of bacteriologically controlling the treatment of periapical infection. *Dent Cosmos* 1932; 74: 789-9.
580. Olie S. Evaluation of culturing in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962; 15: 727-30.
581. Engström B, Lundberg M. The correlation between positive culture and the prognosis of root canal therapy after pulpectomy. *Odontol Revy* 1965; 16: 193-203.
582. Stobberink EE, Eggink CO. The value of the bacteriological culture in endodontics. II. The bacteriological flora of endodontic specimens. *Int Endod J* 1982; 15: 87-93.
583. Sargenti A. *N2-Rationelle Endodontie*. Quintessenz, Berlin 1980.
584. Spångberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 35: 402-14.
585. Oswald RJ, Cohn SA. Systemic distribution of lead from root canal fillings. *J Endod* 1975; 1: 59-63.
586. Chong R, Senzer J. Systemic distribution of ²¹⁰PbO from root canal fillings. *J Endod* 1976; 2: 381-4.
587. Peron LC, Toffaletti JG. Concentration of lead in various endodontic filling materials. *J Endod* 1976; 2: 21-4.
588. Grossman LI. Paresthesia from N2 or N2 substitute. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 45: 114-5.
589. Grossman LI, Tatoi J. Paresthesia from N2. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46: 700-1.
590. Cohler CM, Newton CW, Patterson SS, Kafrawy AH. Studies of Sargenti's technique of endodontic treatment: short-term response in monkeys. *J Endod* 1980; 6: 473-8.
591. Kaufman AY, Rosenberg L. Paresthesia caused by Endomethasone. *J Endod* 1980; 6: 529-31.
592. Newton CW, Patterson SS, Kafrawy AH. Studies of Sargenti's technique of endodontic treatment: six-month and one-year responses. *J Endod* 1980; 6: 509-17.
593. West NM, England MC, Safavi K, Green DB. Levels of lead in blood of dogs with RC-2B root canal fillings. *J Endod* 1980; 6: 598-601.

-
594. Hörsted P, Hansen JC, Langeland K. Studies on N2 cement in man and monkey-cement lead content, lead blood level, and histologic findings. *J Endod* 1982; 8: 341-50.
595. Padachey N, Patel V, Santerre P, Cvitkovitch D, Lawrence HP, Friedman S. Resistance of a novel root canal sealer to bacterial ingress in vitro. *J Endod* 2000; 26: 656-9.
596. Schäfer E, Al Behaissi AA. pH changes in root dentin after root canal dressing with gutta-percha points containing calcium hydroxide. *J Endod* 2000; 26: 665-7.
597. Rivera EM, Williams K. Placement of calcium hydroxide in simulated canals: comparison of glycerin versus water. *J Endod* 1994; 20: 445-8.
598. Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 80: 459-64.
599. Safavi K, Nakayama A. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. *J Endod* 2000; 26: 649-51.
600. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Auffray Y. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*, adaptation, cross-protection and changes in protein synthesis. *Appl Environ Microbiol* 1963; 63: 812-4.
601. Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY et al. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod* 2000; 26: 652-55.
602. Roane JB, Dryden JA, Grimes EW. Incidence of postoperative pain after single- and multiple-visit endodontic procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55: 68-72.
603. Albashaireh ZSM, Alnegrish AS. Postobturation pain after single- and multiple-visit endodontic therapy. A prospective study. *J Dent* 1998; 26: 227-32.
604. Mulhern JM, Patterson SS, Newton CW, Ringel AM. Incidence of postoperative pain after one-appointment endodontic treatment of asymptomatic pulpal necrosis in single-rooted teeth. *J Endod* 1982; 8: 370-5.
605. Oliet S. Single-visit endodontics: a clinical study. *J Endod* 1983; 9: 147-52.
606. Ørstavik D, Sigurdsson A, Moiseiwitsch J, Yamauchi S, Trope M. Sensory and affective characteristics of pain following treatment of chronic apical periodontitis. *J Dent Res* 1996; 75: 373 (Spec. Iss. Abstr. 2848).
607. Miyasaki E, Bueno CES, Okino Neto K, Meneghini G, Hizatugu R. Postoperative pain after root canal treatment in symptomatic nonvital teeth. *J Endod* 1999; 25: 298 (Abstr. PR 2).
608. Soltanoff W. A comparative study of the single-visit and the multiple-visit endodontic procedure. *J Endod* 1978; 4: 278-81.

-
609. Pekruhn RB. Single-visit endodontic therapy: a preliminary clinical study. *J Am Dent Assoc* 1981; 103: 875-7.
 610. Chailertvanitkul P, Saunders WP, MacKenzie D. Coronal leakage of obturated root canals after long-term storage using a polymicrobial marker. *J Endod* 1997; 23: 610-3.
 611. Chailertvanitkul P, Saunders WP, MacKenzie D. Coronal leakage in teeth root-filled with gutta-percha and two different sealers after long-term storage. *Endod Dent Traumatol* 1997; 13: 82-7.
 612. Malone KH, 3rd, Donnelly JC. An in vitro evaluation of coronal microleakage in obturated root canals without coronal restorations. *J Endod* 1997; 23: 35-8.
 613. Ricucci D, Gröndahl K, Bergenholtz G. Periapical status of root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration or caries. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90: 354-9.
 614. Tronstad L, Asbjørnsen K, Døving L, Pedersen I, Eriksen HM. Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 218-221.
 615. Adib V, Spratt D, NG YL, Gulabivala K. An investigation into the microflora of root filled canals associated with periapical lesions. *Int Endod J* 1999; 33: 143 (Abstr.).
 616. Safavi KE, Dowden WE, Langeland K. Influence of delayed coronal permanent restoration on endodontic prognosis. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 187-91.

13 Glossar/Abkürzungen

LPS	Lipopolysaccharide, Zellwandbestandteile gramnegativer Mikroorganismen
LTA	Lipoteichoic acid, Lipoteichonsäuren, Zellwandbestandteile grampositiver Mikroorganismen
TNF	Tumor necrosis factor, Zytokin
IL	Interleukin, Zytokin
PGE	Prostaglandin E, Zytokin
Ca(OH) ₂ oder CH	Kalziumhydroxid
CMCP	Kampfermonochlorphenol
NaOCl	Natriumhypochlorit
CHX	Chlorhexidin, zumeist in Form von Chlorhexidindigluconat
CFU	Colony forming unit, Kolonie-bildende Einheit
GP	Guttapercha
PMMA	Polymethylmethacrylat
RTF	Reduced Transfer Fluid, sauerstoffreduziertes Medium zum Transport anaerober Mikroorganismen
TSB	Trypticase soy broth, Tryptikase-Soja-Bouillon, Nährmedium

14 Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Professor Jean-François Roulet bedanken, der mir auf meinem Weg alle Freiheiten und Unterstützungen gewährte, die ich benötigte, der mich ermutigte, mir humorvoll und freundlich mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Des weiteren danke ich Herrn Professor Klaus-Roland Jahn, der mich hervorragend motiviert hat und immer hilfreich und aufmunternd zur Verfügung stand.

Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit danke ich Frau Dr. Linda Levin, Herrn Dr. Howard Reisner und Herrn Prof. Martin Trope, University of North Carolina at Chapel Hill (**Studie 1**), Herrn Sascha Zilliges sowie Herrn Dr. Reinhold Schiller, Frau Petra Wiedersatz und Herrn Prof. Ulf Göbel, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Humboldt Universität Berlin (**Studie 2**), Herrn Ralf Wussogk (**Studie 3**) Herrn Gerald West (**Studie 4**), und Herrn PD Dr. Stefan Zimmer und Herrn Prof. Jean-François Roulet, Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin, Charité, Humboldt Universität Berlin (**Studie 2, 3 und 4**).

Ein besonders warmer Dank gebührt Herrn Professor Martin Trope und Frau Doktor Mary T. Pettiette, ohne die ich nicht dort stünde, wo ich heute bin. Ihre ständige fachliche und menschliche Unterstützung, ihre Motivation, Förderung, Freundschaft und das Vertrauen, das sie mir entgegenbrachten, haben mir sehr geholfen und mich immer wieder ermutigt, auch in schwierigen Situationen durchzuhalten und weiterzumachen.

Ich möchte auch der gesamten Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin der Charité danken für die Unterstützung, Toleranz und Freundschaft, die mir entgegengebracht wurde, speziell genannt seien Dr. Blunck, Dr. Lösche, Dr. Bizhang, Dr. Chun, Dr. Seemann und Herr Saul.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Privatdozent Doktor Stefan Zimmer, meinen Mann, der sich liebevoll um mich gekümmert, mich unterstützt und motiviert hat, immer für mich da war und hilfreich zur Seite stand.